



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS E PROGNÓSTICO DE
HEMANGIOSSARCOMA ESPLÉNICO EM CÃO**

INÊS ISABEL PACHECO DOS SANTOS

COMPOSIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Teresa da Costa
Mendes Vítor Villa de Brito

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

Doutor Jorge Manuel de Jesus
Correia

ORIENTADOR

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS E PROGNÓSTICO DE
HEMANGIOSSARCOMA ESPLÉNICO EM CÃO**

INÊS ISABEL PACHECO DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

COMPOSIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Teresa da Costa
Mendes Vítor Villa de Brito

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

Doutor Jorge Manuel de Jesus
Correia

ORIENTADOR

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2018

LISBOA

Agradecimentos

À professora Berta São Braz, pelo excelente trabalho de orientação, boa disposição e empenho em ajudar-me em tudo o que foi necessário, com a maior rapidez. É uma honra poder partilhar consigo esta etapa do meu percurso académico. Tê-la-ei sempre como um modelo de profissionalismo, rigor e excelência.

Ao Doutor Gonçalo Vicente, meu co-orientador, sempre de sorriso na cara a disfarçar as habituais olheiras. Mesmo nos seus momentos de grande trabalho e preocupação, arranjou sempre espaço para me ouvir e ajudar. Considero-o meu mestre, por quem nutro um sincero respeito e consideração. Por toda a confiança que sempre depositou em mim, só espero que um dia o possa orgulhar com o meu trabalho. Obrigada por todo o tempo que dispensou comigo, para me orientar e para me transmitir os seus conhecimentos, pela sua contagiante boa disposição que tornou todos os processos de aprendizagem tão cativantes.

À Doutora Joana Pontes, pelo apoio incondicional nos momentos de maior stress, pela aprendizagem contínua e pelas conversas alheias à medicina veterinária que permitiram a criação de uma forte amizade.

Ao professor Telmo Nunes, pela paciência e preciosa ajuda na análise estatística.

A toda a família do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária – médicos veterinários, enfermeiros, auxiliares e rececionistas, por terem contribuído para que o meu estágio curricular fosse melhor do que alguma vez imaginei. Foram pessoas com quem tive o privilégio de trabalhar e aprender.

Às minha amigas e colegas de curso, Ana Rita Santos, Catarina Montalvão, sem as quais esta dissertação não estaria feita a tempo e horas com certeza, estou grata pelo apoio incondicional.

À minha família, por me aturarem nos bons e maus momentos, por me erguerem a cabeça quando ela está em baixo, e por me incentivarem a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir dos meus objetivos.

ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS E PROGNÓSTICO DE HEMANGIOSSARCOMA ESPLÊNICO EM CÃO

Resumo

O hemangiossarcoma é o tumor esplênico mais frequente em cães, na maioria dos quais se observa uma anemia. Se por um lado, a arquitetura vascular tumoral alterada gera uma lise eritrocitária, por outro, a sua natureza endotelial, a presença de cavidades preenchidas por sangue e a sua característica friabilidade, justificam a facilidade com que se verifica rutura neoplásica, dando origem a um quadro de hemorragia interna. De fato, a apresentação clínica mais frequente de um animal com hemangiossarcoma esplênico traduz-se por um quadro de hemoperitoneu. De referir que apesar de a coexistência de uma lesão esplênica e de hemoperitoneu constituir uma forte suspeita de hemangiossarcoma esplênico, apenas a análise histopatológica permitirá o seu diagnóstico definitivo.

No momento em que é detetada uma lesão no baço, associada ou não a rutura, o médico veterinário terá que lidar com as questões habitualmente colocadas pelos proprietários dos animais acerca do prognóstico e da sobrevivência expectável para o quadro clínico em questão (consoante a ocorrência de rutura esplênica ou não), bem como acerca das várias opções terapêuticas.

Deste modo, no presente trabalho pretendeu-se avaliar a associação entre os parâmetros eritrocitários indicadores de anemia (hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos), e o prognóstico de cães com hemangiossarcoma esplênico. Nesse sentido, foi realizada uma análise de sobrevivência para os grupos estabelecidos por valores limite/*cut-off* de 29.2%, $3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$, e 8.97 g/dl para o hematócrito, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina, respetivamente, e entre os quais se concluiu existir uma diferença significativa. Também foi efetuada uma análise de sobrevivência tendo em conta a presença inicial de rutura ou não, e de acordo com o tratamento efetuado (esplenectomia ou esplenectomia associada a posterior quimioterapia). Para o grupo de cães com rutura esplênica e submetidos apenas a esplenectomia, foi obtida uma menor mediana de sobrevivência.

Assim, e apesar das limitações do estudo, os resultados obtidos podem ser de utilidade para o clínico no estabelecimento de um prognóstico e da terapêutica a aplicar em casos de hemangiossarcoma esplênico.

Palavras-chave: hemangiossarcoma esplênico, cão, parâmetros eritrocitários, prognóstico

ASSOCIATION BETWEEN ERYTHROCYTE PARAMETERS AND PROGNOSIS OF SPLENIC HEMANGIOSARCOMA IN DOG

Abstract

Hemangiosarcoma is the most common splenic tumor in dogs, most of which are anemic. If, on the one hand, the altered tumor vascular architecture generates an erythrocyte lysis, on the other hand, its endothelial nature, the presence of blood filled cavities and its characteristic friability, justify the ease with which there is neoplastic rupture, giving rise to an internal hemorrhage. In fact, the most frequent clinical presentation of an animal with splenic hemangiosarcoma translates into a hemoperitoneum. It should be noted that although the coexistence of a splenic lesion and hemoperitoneum constitutes a strong suspicion of splenic hemangiosarcoma, only the histopathological analysis will allow its definitive diagnosis.

At the time a spleen lesion is detected, whether or not there is a rupture, the veterinarian will have to deal with the issues usually posed by the owners of the animals about the prognosis and the expected survival for the clinical picture in question (depending on the occurrence of splenic rupture or not), as well as the various therapeutic options.

The aim of this study was to evaluate the association between erythrocyte parameters indicative of anemia (hematocrit, hemoglobin concentration and erythrocyte count), and the prognosis of dogs with splenic hemangiosarcoma. In that sense, a survival analysis was performed for the groups established by limit/cut-off values of 29.2%, $3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$, and 8.97 g/dl for the hematocrit, erythrocyte count and hemoglobin concentration, respectively, and between which it was concluded that there was a significant difference. A survival analysis was also performed considering the initial presence of rupture or not, and according to the treatment performed (splenectomy or splenectomy associated with subsequent chemotherapy). For the group of dogs with splenic rupture and only submitted to splenectomy, a lower median survival was obtained.

Thus, despite the limitations of the study, the results obtained may be of use to the clinician in the establishment of a prognosis and the therapy to be applied in cases of splenic hemangiosarcoma.

Key words: splenic hemangiosarcoma, dog, erythrocyte parameters, prognosis

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Gráficos	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR	1
II. Introdução Geral	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Componente eritrocitária do sangue.....	4
1.1. Eritropoiese.....	4
1.2. Anemia.....	5
1.2.1. Caraterização e classificação	6
2. Baço.....	8
2.1. Anatomia e Histologia	8
2.2. Circulação esplénica	9
2.3. Funções do baço.....	11
2.3.1. Reserva	11
2.3.2. Hematopoiese	11
2.3.3. Manutenção eritrocitária	11
2.3.4. Imunológica	12
2.4. Esplenomegália.....	13
3. Hemangiossarcoma	14
3.1. Etiologia.....	14
3.2. Prevalência, fatores de risco e predisposição.....	15
3.3. Distribuição primária e metastática	16
3.4. Diagnóstico	17
3.4.1. Quadro clínico de hemangiossarcoma esplénico.....	17
3.4.1.1. Quadro clínico de hemangiossarcoma não esplénico.....	18
3.4.2. Caracterização macroscópica	19
3.4.3. Caracterização microscópica.....	19
3.4.3.1. Análise citológica e histopatológica.....	20

3.4.4. Distinção entre lesões esplênicas benignas e malignas.....	21
3.4.5. Diagnóstico laboratorial.....	23
3.4.5.1. Hemograma e Bioquímicas	23
3.4.5.2. Testes de coagulação	25
3.4.5.3. Análise do líquido de derrame	26
3.4.6. Diagnóstico imagiológico.....	26
3.4.6.1. Radiografia.....	26
3.4.6.2. Ecocardiografia.....	27
3.4.6.3. Ecografia	27
3.4.6.4. Tomografia Computorizada e Ressonância Magnética	28
3.4.7. Outros meios de diagnóstico	29
3.5. Tratamento.....	30
3.5.1. Esplenectomia.....	31
3.5.1.1. Fatores de risco e prognóstico.....	33
3.5.2. Quimioterapia.....	33
3.5.2.1. Reações secundárias	34
3.5.2.2. Compostos quimioterápicos convencionais.....	36
3.5.2.2.1. Doxorrubicina	38
3.5.2.2.2. Doxorrubicina e ciclofosfamida.....	39
3.5.2.2.3. Doxorrubicina, ciclofosfamida e vincristina.....	40
3.5.2.2.4. Doxorrubicina, dacarbazina e vincristina	40
3.5.2.2.5. Doxorrubicina e dacarbazina	41
3.5.2.2.6. Epirubicina	41
3.5.2.2.7. Ifosfamida.....	42
3.5.3. Quimioterapia metronômica.....	43
3.5.4. Outros tratamentos anti-angiogénicos	44
3.5.4.1. Minociclina.....	45
3.5.4.2. Toceranib.....	45
3.5.5. Imunoterapia.....	46
3.5.5.1. Muramil tripéptido fosfatidiletanolamina liposomal encapsulado (L-MTP-PE)	46
3.5.5.2. Vacina	47
IV. ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS E PROGNÓSTICO DE HEMANGIOSSARCOMA ESPLÊNICO EM CÃO	48
1. Objetivos	48
2. Materiais e Métodos.....	49
2.1 Critérios de inclusão e exclusão	49
2.2. Recolha de dados	49
2.3. Análise de dados	50

3. Apresentação e Discussão de resultados.....	51
3.1. Análise de sobrevivência consoante o tratamento	53
3.2. Análise de sobrevivência consoante o estadio clínico (I, II ou III) e a presença ou não de rutura esplénica	55
3.3. Análise dos parâmetros eritrocitários consoante a presença ou não de rutura esplénica	57
3.4. Análise de correlação entre os parâmetros eritrocitários e o tempo de sobrevivência.....	59
3.5. Análise de sobrevivência consoante o valor limite/cut-off para o hematócrito (26.2%), contagem de eritrócitos ($3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$) e concentração de hemoglobina (8.97 g/dl)	60
3.6. Limitações do estudo	62
4. Perspetivas futuras	63
BIBLIOGRAFIA	65

Índice de Figuras

Figura 1 – Alterações celulares associadas à diferenciação dos eritrócitos.....	5
Figura 2 – Constituição histológica do baço.....	9
Figura 3 – Circulação esplénica.....	10
Figura 4 – Alterações morfológicas eritrocitárias associadas a hemangiossarcoma.....	25

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação e algumas causas de esplenomegália.....	14
Tabela 2 – Estadiamento clínico de hemangiossarcoma.....	22
Tabela 3 – Estadiamento clínico de hemangiossarcoma esplênico canino.....	22
Tabela 4 – Sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico após esplenectomia.....	32
Tabela 5 – Medianas de sobrevivência associadas a protocolos de quimioterapia, após esplenectomia.....	37
Tabela 6 – Medianas de sobrevivência associadas à administração de minociclina e toceranib.....	46
Tabela 7 - Medianas de sobrevivência obtidas pela imunoterapia e quimioterapia convencional.....	48
Tabela 8 - Distribuição dos animais em função da presença ou não de ruptura esplênica e do estadio clínico.....	51
Tabela 9 - Distribuição dos animais em função do tratamento efetuado.....	52
Tabela 10 – Análise comparativa de sobrevivência entre os grupos definidos para os diferentes parâmetros eritrocitários (hematócrito, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina).....	62

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição em caixa-de-bigodes da idade dos animais em estudo.....	52
Gráfico 2 – Distribuição rática dos animais em estudo	53
Gráfico 3 – Análise de sobrevivência <i>Kaplan-Meier</i> dos animais submetidos a esplenectomia, e esplenectomia seguida de quimioterapia	54
Gráfico 4 – Análise de sobrevivência <i>Kaplan-Meier</i> de animais com rutura esplénica sujeitos a esplenectomia e a esplenectomia e posterior quimioterapia.....	54
Gráfico 5 – Análise de sobrevivência <i>Kaplan-Meier</i> dos animais pertencentes aos diferentes estadios (I, II ou III) de hemangiossarcoma esplénico	56
Gráfico 6 – Análise de sobrevivência <i>Kaplan-Meier</i> de animais com e sem rutura esplénica	57
Gráfico 7 – Distribuição em caixa-de-bigodes do hematócrito em cães com e sem rutura esplénica	58
Gráfico 8 – Distribuição em caixa-de-bigodes da contagem de eritrócitos em cães com e sem rutura esplénica.....	58
Gráfico 9 - Distribuição em caixa-de-bigodes da concentração de hemoglobina em cães com e sem rutura esplénica.....	58
Gráfico 10 – Análise de correlação de <i>Spearman</i> entre o hematócrito e o tempo de sobrevivência.....	59
Gráfico 11 – Análise de correlação de <i>Spearman</i> entre a contagem de eritrócitos e o tempo de sobrevivência.....	59
Gráfico 12 - Análise de correlação de <i>Spearman</i> entre a concentração de hemoblogina e o tempo de sobrevivência.....	60
Gráfico 13 - Análise de sobrevivência <i>Kaplan-Meier</i> dos animais com um valor de hematócrito $\geq 26.2\%$ e $< 26.2\%$	60
Gráfico 14 - Análise de sobrevivência <i>Kaplan-Meier</i> dos animais com uma contagem de eritrócitos $\geq 3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$ e $< 3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$	61

Gráfico 15 - Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais com uma concentração de hemoglobina ≥ 8.97 g/dl e < 8.97 g/dl.....61

Lista de Abreviaturas

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

COX-1 – Cicloxigenase 1

COX-2 – Cicloxigenase 2

DI – Decilitro

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FGF - *Fibroblast growth factor*

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g – Grama

L-MTP-PE - *Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine*

mg – Miligrama

m² – Metro ao quadrado

PALS – *Periarteriolar lymphoid sheath*

PAMS – *Periarterial macrophage sheath*

PDGF – *Platelet-derived growth factor*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

VCM – Volume corpuscular médio

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

µl - Microlitro

µm – Micrómetro

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR

O meu estágio curricular realizou-se no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, desde 8 de Setembro de 2017 até 8 de Março de 2018, perfazendo um total de 6 meses.

Os turnos de trabalho tiveram uma duração de 8 (das 8 às 16h ou das 13h às 21h) ou 12 horas (das 8h às 20h ou das 20h às 8h). Os turnos das 12 horas decorreram no serviço de Internamento. Quando este decorria no período da noite, era prestado auxílio a eventuais urgências médicas e/ou cirúrgicas. De referir que uma parte do meu estágio equivalente a 25 horas (5 turnos cada um de 5 horas) foi dedicada à prestação de cuidados aos animais presentes na Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas.

Essencialmente, os serviços associados aos turnos de 8 horas contemplados no programa de estágio foram os seguintes: Medicina Geral (328 horas), Medicina Interna (80 horas), Ecografia (80 horas), Radiologia (80 horas), Cirurgia (160 horas), Oncologia (32 horas), Oftalmologia (48 horas) e Dermatologia (80 horas).

Na Dermatologia tive a oportunidade de participar na colheita, coloração, visualização e interpretação de amostras de pele obtidas por raspagem superficial ou profunda, pêlos e zaragotas. Os animais apresentados exibiam doenças como atopia, alergia alimentar, hiperadrenocorticism, otites, dermatites, Leishmaniose, malasseziose, penfigo foliáceo, dermatofitose, ectoparasitose, entre outras. A maioria exibia alterações como alopecia, eritema e prurido.

Na Oftalmologia segui vários casos de cataratas e úlceras da córnea, assim como descemetocelo, pannus, queratites (incluindo eosinofílica), hifema, conjuntivite, entre outras patologias, além de ter assistido a uma eletrorretinografia e algumas cirurgias de correção de cataratas.

No serviço de Oncologia, participei no seguimento e realização de quimioterapia em animais diagnosticados com neoplasias, tais como mastocitoma, carcinomas e linfoma.

Na Radiologia, tive a oportunidade de participar na execução de projeções radiográficas e tomografias axiais computadorizadas, e interpretar posteriormente as imagens obtidas – problemas ortopédicos (luxações, fraturas, displasia de anca e cotovelo), doenças do trato respiratório e digestivo, incluindo torções gástricas, ruturas de órgãos, entre muitas outras. Além disso, também assisti a várias mielografias.

O serviço de Ecografia contemplou o auxílio, a execução e a interpretação das imagens obtidas de ecografias abdominais e cardíacas, além de cistocenteses e punções aspirativas por agulha fina.

Os casos da Medicina Interna foram maioritariamente do foro endocrinológico e gastrointestinal, os quais foram discutidos, culminando na construção de uma lista de diagnósticos diferenciais, plano de diagnóstico e plano terapêutico.

No serviço de Cirurgia, participei como ajudante do cirurgião em algumas destartarizações, castrações e esterilizações, assim como cirurgias ortopédicas de correção da rutura do ligamento cruzado do joelho, resseção da cabeça do fémur, amputação e hérnias vertebrais. Também fui responsável pelo fornecimento de cuidados necessários no período pré e pós-cirúrgico e monitorização da anestesia.

Por último, de referir a grande fatia do estágio – a Medicina Geral. Neste serviço aprendi não só a pôr em prática os meus conhecimentos prévios, como também adquiri muitos outros, assim como aprendi a lidar com as mais variadas situações, incluindo urgências. Desde vacinações e desparasitações, a doenças do foro neoplásico, endocrinológico, gastrointestinal, reprodutor, urinário, infeccioso, entre muitas outras.

II. Introdução Geral

O hemangiossarcoma é o tumor esplênico mais frequente na espécie canina, e caracteriza-se pela presença de canais vasculares tortuosos e irregulares preenchidos por sangue, depósitos de fibrina e trombos, delineados por células endoteliais neoplásicas heterogêneas, com graus de diferenciação e morfologia variáveis. Assim se justifica a consequente lise eritrocitária, denominada por hemólise microangiopática. Também a friabilidade, associada à natureza hemorrágica e típica existência de cavernas preenchidas por sangue, traduz a facilidade com que se verifica ruptura neoplásica, dando origem a um quadro de hemoperitôneo. Nesse sentido, a anemia faz parte do diagnóstico laboratorial tipicamente registrado num animal com hemangiossarcoma esplênico, seja de natureza hemolítica e/ou hemorrágica.

Apesar do diagnóstico definitivo ser histopatológico, o hemangiossarcoma esplênico é um dos diagnósticos diferenciais quando se detecta uma massa esplênica. No entanto, a coexistência de anemia e de uma lesão no baço, constitui uma forte suspeita de hemangiossarcoma, reforçada no caso de se verificar adicionalmente hemoperitôneo. A apresentação deste diagnóstico provável aos detentores dos animais, levantará por parte destes, questões relativamente ao prognóstico, à sobrevivência expectável face ao quadro clínico, e às várias opções terapêuticas que podem ser implementadas.

Vários estudos têm relacionado a sobrevivência com a presença ou não de ruptura esplênica, e com o tratamento efetuado (esplenectomia ou esplenectomia associada a posterior quimioterapia). No entanto, nenhum avaliou a possível correlação da taxa de sobrevivência com os parâmetros eritrocitários, apenas sendo referida a ocorrência de anemia na grande maioria dos animais diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico.

O presente trabalho visa avaliar se essa correlação pode ser estabelecida. Nesse sentido, os parâmetros eritrocitários indicadores de anemia (hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos) foram relacionados com a sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico, e foram definidos valores *cut-off* para cada um deles como possíveis indicadores de um melhor ou pior prognóstico.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Componente eritrocitária do sangue

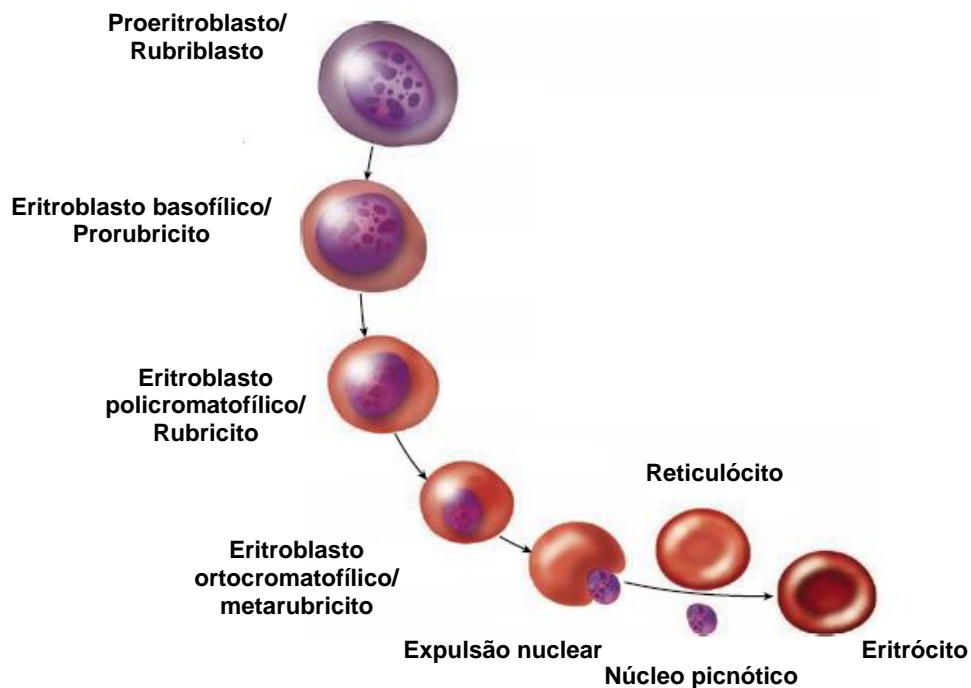
O sangue é constituído pelo plasma e pela componente celular, na qual predominam os eritrócitos, células responsáveis pelo fornecimento de oxigénio aos tecidos (Messick, 2006). No caso particular dos cães, o tempo de vida eritrocitário circulante varia entre 110 (Messick, 2006) e 120 dias (Couto, 2014a). Estas células são caracterizadas morfológicamente por uma forma bicôncava, de área central mais pálida e diâmetro aproximado de 7 μm (Messick, 2006).

1.1. Eritropoiese

Toda a medula óssea é vermelha durante o desenvolvimento e crescimento dos animais, enquanto que na vida adulta restringe-se a alguns locais como as estérnebras, costelas, vértebras e ossos cranianos (Banks, 1993). Os restantes locais vão sendo substituídos por medula óssea amarela, maioritariamente constituída por tecido adiposo, mas com capacidade de conversão em tecido hematopoiético funcional (Banks, 1993). Além da produção de eritrócitos, a medula óssea vermelha é responsável pela produção dos granulócitos, agranulócitos e plaquetas (Banks, 1993). Este tecido é constituído pelo estroma (que cria um ambiente propício à proliferação das células progenitoras através da produção local de citocinas, tais como fatores estimuladores de colónias e interleucinas), pelos cordões de células hematopoiéticas, e pelos sinusóides, através dos quais as células recentemente diferenciadas entram em circulação (Mescher, 2016).

Durante a eritropoiese, que dura aproximadamente 1 semana, ocorre uma diminuição do volume celular e nuclear, a condensação da cromatina até à formação e posterior expulsão do núcleo picnótico, a perda de organelas, e uma decrescente basofilia (diminuição do número de ribossomas produtores de hemoglobina), acompanhada de uma crescente eosinofilia (coincidente com o aumento da hemoglobina sintetizada) (Mescher, 2016). A figura 1 ilustra as alterações celulares associadas à diferenciação dos eritrócitos. Por fim, verifica-se a libertação na circulação sanguínea de células ainda com algum conteúdo ribossómico (reticulócitos), conteúdo esse perdido em 1 a 2 dias (Messick, 2006). Assim se formam eritrócitos maduros, cuja síntese de hemoglobina se apresenta finalizada. Num animal saudável, a percentagem de reticulócitos em circulação é inferior a 1% (Rizzi, Meinkoth & Clinkenbeard, 2010).

Figura 1 – Alterações celulares associadas à diferenciação dos eritrócitos (adaptado de Mescher, 2016)



O maior estímulo para a produção eritrocitária é a hipoxia tissular – os rins e outros órgãos produzem o fator eritropoiético renal/eritrogenina, que, por sua vez, reage com uma α -globulina plasmática produzida pelo fígado, de modo a produzir a eritropoietina (Banks, 1993). Esta última estimula, de forma imediata, a proliferação e diferenciação das células progenitoras da linha eritróide (Messick, 2006).

1.2. Anemia

A anemia define-se por uma depleção da massa eritrocitária no sangue total, ou seja, diminuição dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos (Kerr, 2002; Thrall, 2012).

As causas possíveis de anemia são a destruição (hemólise), perda (hemorragia) ou deficiente produção eritrocitária (Valli, Kiupel & Bienzle, 2016). Algumas causas de anemia hemorrágica são trauma, cirurgia, úlceras gastrointestinais, neoplasia (incluindo rutura de um tumor como hemangiossarcoma esplênico), coagulopatia ou trombocitopenia (Villiers, 2016). A anemia hemolítica pode ser secundária a um processo imunomediado (primário ou secundário) ou infeccioso, lesão oxidativa, trauma mecânico (tal como microangiopatia, verificada no hemangiossarcoma), defeitos hereditários dos eritrócitos, hipofosfatemia, entre outros (Villiers, 2016). Por último, a deficiente produção de eritrócitos pode estar presente aquando de neoplasia medular primária ou secundária, de processo inflamatório crónico, de

deficiência em ferro, cobalamina ou eritropoetina; ou estar associada a alteração das células progenitoras medulares (anemia aplástica, por exemplo) (Valli, Kiupel & Bienzle, 2016).

A contagem total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina no sangue variam paralelamente ao valor do hematócrito, cujos valores são úteis não só no diagnóstico de anemia, mas também no cálculo dos dois parâmetros a seguir referidos e relevantes na caracterização da anemia – o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), respetivamente (Kerr, 2002). Os valores destes índices devem ser sempre interpretados de forma crítica. Note-se que a concentração de hemoglobina pode estar falsamente elevada no caso de uma amostra lipémica e que um animal desidratado pode revelar uma hemoconcentração e mascarar a anemia (Mills, 2000).

A anemia pode ser relativa, no caso de existir uma massa eritrocitária normal, mas em que se verifica um volume plasmático elevado, seja secundariamente a fluidoterapia, ou ao sequestro de eritrócitos devido a esplenomegália. Por outro lado, a anemia pode ser absoluta, se a massa eritrocitária estiver efetivamente diminuída e o volume plasmático normal (Mills, 2000).

1.2.1. Caraterização e classificação

A anemia pode ser classificada como regenerativa, quando associada a uma hemólise intravascular ou extravascular (secundária a eritrofagia pelos macrófagos do baço, fígado e medula), ou a hemorragia (interna ou externa); ou não regenerativa, aquando de uma deficiente produção medular (Mills, 2000). Embora a melhor prova de uma hemólise intravascular seja a presença de hemoglobinúria, outros sinais como a icterícia podem estar presentes, embora esta última possa ser detetada numa hemólise extravascular, assim como a esplenomegália e hepatomegália (Weiss & Tvedten, 2012a).

Após o diagnóstico de anemia, a sua caracterização passa pela avaliação da resposta regenerativa medular, dos índices eritrocitários (VCM e CHCM) e da morfologia eritrocitária (Mills, 2000).

A extensão da resposta regenerativa medular pode ser avaliada subjetivamente através da observação de policromasia - numerosas células policromatófilas e de conteúdo basofílico/ribossomal intenso (reticulócitos), criando diferentes intensidades na cor das células vermelhas observadas no esfregaço sanguíneo (Weiss & Tvedten, 2012a). Assim sendo, a policromasia correlaciona-se com reticulocitose. Objetivamente, a regeneração avalia-se pela contagem de reticulócitos em circulação – uma anemia regenerativa traduz uma concentração de reticulócitos $\geq 60000/\mu\text{L}$ (Thrall, 2012), cuja produção máxima ocorre aproximadamente 7 dias depois da instalação da anemia (Zabolotzky & Walker, 2014). É frequente não haver sinais de regeneração nos primeiros 3 a 4 dias (tempo necessário para

a produção de eritrócitos) após o episódio desencadeador, pelo que durante este período verifica-se uma anemia pré-regenerativa (Mills, 2000). Outros indicadores menos específicos de resposta medular são a presença de metarrubricitos, corpos de *Howell-Jolly*, macrocitose e anisocitose (Tvedten, 2010).

O VCM reflete o volume médio dos eritrócitos, o que permite o diagnóstico de uma anemia macrocítica, microcítica ou normocítica consoante o valor esteja elevado, diminuído ou dentro do intervalo de referência, respetivamente (Weiss & Tvedten, 2012b). O registo de uma macrocitose indica que está a ocorrer uma libertação medular de células imaturas na circulação (reticulócitos) em resposta à anemia patente (Thrall, 2012). Nesse caso, num esfregaço de sangue periférico, observam-se células vermelhas de tamanhos diferentes (anisocitose) (Weiss & Tvedten, 2012a). Por outro lado, uma anemia normocítica indica uma resposta não regenerativa ou pré-regenerativa (observada nos primeiros 3 a 4 dias após perda ou destruição de eritrócitos) (Thrall, 2012). O cálculo do VCM, cuja unidade é o fentolitro (fl), baseia-se na seguinte fórmula: $VCM (fl) = \text{Hematócrito } (\%) \times 10 / \text{Contagem de eritrócitos } (10^6)$.

A CHCM traduz a concentração média de hemoglobina num eritrócito, pelo que a anemia é classificada como hiperocrómica, hipocrómica ou normocrómica, consoante esse valor esteja elevado, diminuído ou dentro do intervalo de referência (Weiss & Tvedten, 2012b). Note-se que uma CHCM elevada pode ser detetada numa amostra hemolisada, com plasma lipémico, sangue insuficiente relativamente à quantidade de EDTA (há uma atrofia celular), devido a erro laboratorial na medição do hematócrito ou hemoglobina, ou presença de corpos de Heinz (Kerr, 2002). A hipocromasia está tipicamente associada a deficiência em ferro (registada numa hemorragia crónica gastrointestinal, por exemplo) ou a anemia regenerativa, devido à presença de numerosas células imaturas (reticulócitos) em circulação, uma vez que estas ainda têm hemoglobina a ser sintetizada, ao contrário dos eritrócitos maduros (Thrall, 2012). O cálculo da CHCM, expressa em g/dl, baseia-se na seguinte fórmula: $CHCM (g/dl) = \text{Hemoglobina } (g/dl) \times 100 / \text{Hematócrito } (\%)$.

A morfologia eritrocitária é apreciada após observação de um esfregaço de sangue periférico, e alterações observadas fornecem pistas relativamente à doença subjacente e causa da anemia patente. A presença de esquizócitos e acantócitos pode reforçar uma suspeita de hemangiossarcoma, por exemplo (Mills, 2000). Além da policromasia e anisocitose, também a presença de corpos de *Howell-Jolly* (remanescentes nucleares) ou metarrubricitos, pode estar associada a uma anemia regenerativa, embora o aumento do número destes últimos possa ser consequência de doença esplénica, hematopoiese extramedular, sepsis, hiperadrenocorticismismo, leucemia, entre outros (Weiss & Tvedten, 2012a). Também o aumento dos corpos de *Howell-Jolly* pode verificar-se por ausência da

sua remoção pelo baço, seja por insuficiência do mesmo ou após esplenectomia (Messick, 2006).

2. Baço

2.1. Anatomia e Histologia

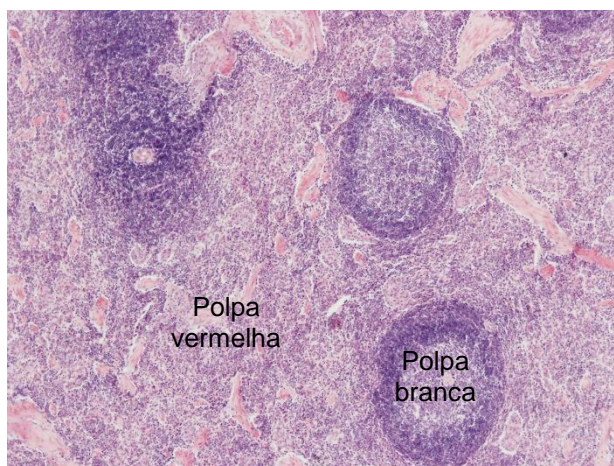
O baço localiza-se no quadrante abdominal cranial esquerdo (Fossum, 2013). A sua posição anatômica varia de acordo com as alterações do seu volume, e em concordância com o grau de distensão gástrica – quando este aumenta, ocorre um deslocamento caudal e ventral do baço (Dyce, Sack & Wensing, 2010), ao passo que quando o estômago está vazio, todo o órgão forra a cavidade abdominal cranial (Tillson, 2003). O ligamento gastroesplênico permite a fixação da extremidade proximal do baço (suspensão pelo grande omento) à grande curvatura do estômago, permitindo um movimento síncrono entre os dois órgãos (Tillson, 2003).

A extremidade dorsal/proximal (cabeça), redonda e em forma de cunha, localiza-se ventralmente ao pilar esquerdo do diafragma, entre a região fúndica gástrica e o rim esquerdo; a extremidade ventral/distal (cauda) caracteriza-se pela sua forma e localização variável, embora normalmente se posicione caudalmente às costelas e cruze a linha média ventral (Tillson, 2003). A conexão das duas extremidades é feita pelo corpo do baço (Larson, 2013).

O baço tem uma forma de língua e possui uma cápsula que, por sua vez, se prolonga para o interior do órgão sob a forma de trabéculas, estruturas estas que servem de suporte ao parênquima formado pela polpa vermelha (80%) e branca (20%) (figura 2) (Tillson, 2003; Mescher, 2016).

A presença de fibras elásticas e musculares lisas ao nível da cápsula e trabéculas permite a contração e relaxamento do órgão – a primeira ocorre após estimulação do sistema nervoso autónomo (Boes & Durham, 2017), enquanto que o segundo pode ser secundário à administração de anestésicos, por exemplo (Dyce et al., 2010). Desta forma, ora o baço se restringe ao interior da caixa torácica, ora se prolonga pelo abdómen caudal (Fossum, 2013).

Figura 2 – Constituição histológica do baço (imagem gentilmente cedida pelo Laboratório de Histologia da FMV, 2018)



A polpa vermelha é constituída pelos sinusóides (delimitados por células endoteliais), cujos microfilamentos contráteis são responsáveis por criar espaços intercelulares, através dos quais os macrófagos de vigilância emitem os seus pseudópodes; e pelos cordões esplênicos, constituídos por uma rede de células e fibras reticulares preenchidas por linfócitos T e B, macrófagos, outros leucócitos, eritrócitos e plaquetas (Mescher, 2016; Boes & Durham, 2017).

A polpa branca é composta pelos folículos/nódulos linfáticos, compostos maioritariamente por linfócitos B, e pelas bainhas periaarteriais linfáticas (PALS) a rodear as arteríolas centrais, e que são compostas predominantemente por linfócitos T (Boes & Durham, 2017). A zona marginal, importante no processamento antigénico, localiza-se entre a polpa branca e vermelha (na qual se identificam macrófagos, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B), e o seio marginal, em continuidade com a artéria central (Boes & Durham, 2017).

2.2. Circulação esplénica

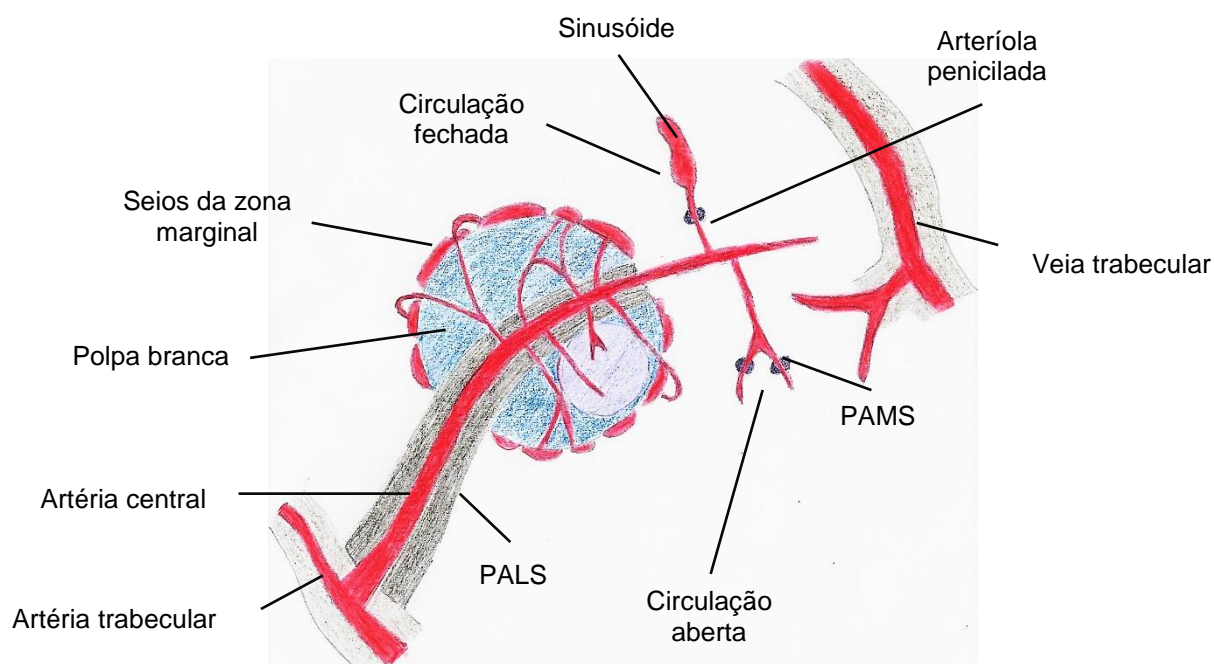
O suprimento sanguíneo do baço deriva da artéria celíaca, que origina a artéria esplénica que, por sua vez, penetra na cápsula ao nível do hilo e segue o seu percurso ao longo das trabéculas (sob a forma de artérias trabeculares), originando as artérias centrais da polpa branca, rodeadas pela PALS (Boes & Durham, 2017). As artérias centrais fornecem linfócitos B e T para o folículo esplênico e para a PALS, respetivamente (Boes & Durham, 2017). Em direção ao seio marginal (artérias radiais) em redor dos folículos esplênicos, várias ramificações são criadas (Boes & Durham, 2017).

Ao nível da polpa vermelha, a ramificação das artérias centrais culmina nas arteríolas peniciladas, rodeadas pelas bainhas periarteriolares macrofágicas (PAMS), pelo que esta é outra região sob vigilância dos macrófagos, além do seio marginal (Boes & Durham, 2017). Por sua vez, as arteríolas peniciladas originam os sinusóides (sistema de circulação fechada) ou desaguam diretamente no estroma dos cordões esplênicos (sistema de circulação aberta) (Mescher, 2016). Os sinusóides apresentam-se em continuidade com as veias trabeculares e a veia esplênica que, por sua vez, abandona o baço ao nível do hilo e culmina na veia porta (Mescher, 2016). No sistema de circulação aberto não há ligação entre arteríolas e sinusóides, pelo que o sangue entra novamente em circulação graças aos espaços interendoteliais criados nos sinusóides (Mescher, 2016). O sistema circulatório fechado/sinusal predomina na espécie canina e traduz-se pela continuidade endotelial arteriovenosa (Richter, 2012).

O sistema circulatório esplênico (figura 3) permite um trânsito rápido e lento de eritrócitos – num quadro de hemorragia e choque hipovolémico, 98% dos eritrócitos transitam rapidamente pelo sistema de circulação fechado, culminando num maior número de eritrócitos em circulação e consequentemente num número menor sequestrado (Tillson, 2003).

Os linfonodos esplênicos dispõem-se ao longo dos vasos esplênicos, não existindo vasos linfáticos aferentes, apenas eferentes, os quais se distribuem ao longo da cápsula e trabéculas, juntamente com os vasos sanguíneos e nervos (Dyce et al., 2010).

Figura 3 – Circulação esplênica



2.3. Funções do baço

O baço é o maior órgão linfóide secundário, constituído pelas duas unidades funcionais já mencionadas, a polpa vermelha e a branca. A polpa vermelha é responsável pela filtração do sangue, isto é, remoção de material estranho e eritrócitos danificados ou senescentes; e pelo armazenamento de ferro, eritrócitos e plaquetas. Por sua vez, a polpa branca participa na resposta imunológica aos antígenos circulantes (Cesta, 2006).

2.3.1. Reserva

A riqueza em fibras elásticas e musculares permite que o baço funcione como reservatório de sangue e consequentemente aumente de volume (Boes & Durham, 2017). Cerca de 30% da massa plaquetária e 10-20% da massa eritrocitária total, respetivamente, estão concentradas no baço (Richter, 2012). Numa situação de stress, hipoxemia ou hemorragia, a contração esplénica promove a libertação dos eritrócitos para a circulação sistémica na tentativa de repor ou suplementar os níveis de oxigenação (Tillson, 2003). Nesse sentido, uma percentagem de 98% dos eritrócitos é direcionada para o sistema circulatório fechado, efetuando uma passagem rápida pelo baço (Tillson, 2003). Assim se compreende que uma perda de sangue equivalente a 40% do volume circulatório seja fatal num cão esplenectomizado (Dillon, Hanks, Nachreiner & Redding, 1980). Também se pode registar uma trombocitose após esplenectomia, na medida em que a função de armazenamento plaquetário cessa (Tillson, 2003).

2.3.2. Hematopoiese

A hematopoiese esplénica ocorre durante o período pré e neonatal, ao passo que o principal órgão hematopoiético num animal adulto é a medula. A reativação da hematopoiese esplénica verifica-se quando existe uma exigência fisiológica significativa (anemia crónica, doença respiratória ou cardiovascular crónica, septicémia, por exemplo). As três linhagens – granulocítica, eritróide e/ou megacariocítica – podem estar envolvidas (Richter, 2012; Valli, Kiupel & Bienzle, 2016). A sua expressão traduz-se por um aumento focal ou generalizado do baço, pelo que deve ser um diagnóstico diferencial de massa esplénica (Tillson, 2003).

2.3.3. Manutenção eritrocitária

Os reticulócitos libertados pela medula permanecem alguns dias no baço para completarem o seu processo de maturação, durante o qual o material intranuclear que tenha persistido é removido, juntamente com o excesso de membrana celular. Assim sendo, os eritrócitos

resultantes entram em circulação com uma menor dimensão e com sua típica forma bicôncava (Richter, 2012).

Os eritrócitos, no fim do seu tempo de vida circulante, não são capazes de atravessar os espaços interendoteliais dos sinusóides, pelo que são fagocitados pelos macrófagos que, por sua vez, ficam repletos de fragmentos eritrocitários (Mescher, 2016). O pigmento sem ferro é devolvido ao sangue e captado pelas células hepáticas; a globina é digerida e direcionada para a produção de aminoácidos; e o ferro fica armazenado nos macrófagos sob a forma de ferritina ou hemossiderina (derivada da degradação da hemoglobina), ou associa-se à transferrina circulante (proteína plasmática transportadora de ferro), complexo este posteriormente captado para a reutilização e síntese de nova hemoglobina na medula (Junqueira & Carneiro, 2011).

Ao contrário dos casos em que se verifica um excesso de eritrócitos defeituosos em circulação, tal como acontece nas anemias hemolíticas agudas graves, a remoção fisiológica de eritrócitos senescentes não justifica por si só uma esplenomegália (Boes & Durham, 2017). Após esplenectomia, é possível que seja observado em circulação um maior número de eritrócitos deformados (Junqueira & Carneiro, 2011), tais como acantócitos, metarrubricitos, células com corpos de Heinz, ou restos nucleares como corpos de *Howell-Jolly* (Tillson, 2003).

2.3.4. Imunológica

O baço filtra os microrganismos presentes no sangue através da ação fagocítica dos macrófagos presentes no seio marginal e nos sinusóides. Posteriormente, os antígenos são transportados até aos folículos da polpa branca, promovendo a proliferação de linfócitos B e respetiva produção de anticorpos, além do sequestro esplênico de linfócitos circulantes, maximizando a resposta imunitária (Richter, 2012). Em suma, a nível esplênico verifica-se a ativação dos macrófagos para o processamento e apresentação de antígenos, a proliferação de linfócitos B e respetiva produção de anticorpos e outras substâncias, e a interação entre os linfócitos T e antígenos (Boes & Durham, 2017). Efetivamente, o baço é o maior produtor de linfócitos B, T e imunoglobulina M (Richter, 2012).

Os macrófagos esplênicos removem eritrócitos alterados, tais como os que apresentam uma incapacidade de se deformarem e entrarem na circulação esplênica (acantócitos e esferócitos), e fagocitam as células vermelhas rodeadas por anticorpos (anemia hemolítica imunomediada) ou infetados por bactérias e hemoparasitas, assim como plaquetas cobertas por imunoglobulinas, observadas aquando de uma trombocitopenia imunomediada (Richter, 2012; Boes & Durham, 2017).

2.4. Esplenomegália

A esplenomegália classifica-se como generalizada ou focal, de consistência branda ou firme (Boes & Durham, 2017), e as suas principais causas encontram-se referidas na tabela 1.

Os mecanismos responsáveis por uma esplenomegália difusa são a inflamação (esplenite), hiperplasia celular, congestão ou infiltração celular. As causas mais comuns de um aumento de volume generalizado do baço canino são a bacteriemia e doença infecciosa crónica (Richter, 2012).

A inflamação e hiperplasia estão associadas à função imunitária previamente descrita, na qual se verifica uma hiperplasia das células mononucleares fagocitárias e linfóides, ou seja, uma esplenomegália hiperplásica, de causa infecciosa ou não (Tillson, 2003). A esplenite pode estar associada à exposição a bactérias, vírus, protozoários, fungos ou parasitas (Richter, 2012). A congestão pode ser consequência de obstrução à drenagem venosa (tal como torsão esplénica ou gástrica), hipertensão portal, administração de barbitúricos ou insuficiência cardíaca direita; e a hiperplasia celular relaciona-se com neoplasia (primária ou metastática), hematopoiese extramedular. A doença de armazenamento lisossomal ou a amiloidose são outras causas possíveis (Richter, 2012; Larson, 2013).

No caso da esplenomegália focal, alguns dos diagnósticos diferenciais são a neoplasia (primária ou metastática), hematopoiese extramedular, hematoma, abscesso ou hiperplasia nodular (Larson, 2013).

Tabela 1 – Classificação e algumas causas de esplenomegália (segundo Boes & Durham, 2017)

ESPLENOMEGÁLIA			
GENERALIZADA		LOCALIZADA	
BRANDA	FIRME	BRANDA	FIRME
Congestão <ul style="list-style-type: none"> • Torsão ou volvo gástrico/esplênico • Insuficiência cardíaca direita • Sedação/Anestesia (Barbitúricos) 	Proliferação celular <ul style="list-style-type: none"> • Hiperplasia linfóide difusa • Hiperplasia histiocítica difusa e fagocitose • Doença granulomatosa difusa (Bacteriana, fúngica, protozoária) 	Hematoma <ul style="list-style-type: none"> • Hiperplasia nodular • Hemangiossarcoma 	Hiperplasia nodular
Anemia hemolítica aguda <ul style="list-style-type: none"> • Auto-imune • Infecção 	Hematopoiese extramedular	Contração esplênica incompleta	Neoplasia primária <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma, sarcoma histiocítico, leiomioma, leiomiossarcoma, fibrossarcoma, mielolipoma, lipossarcoma, sarcoma indiferenciado pleomórfico, hemangiossarcoma sólido, mastocitoma, plasmocitoma
Congestão aguda/Hiperémia <ul style="list-style-type: none"> • Septicémia 	Neoplasia (maioritariamente primária) <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma, mastocitoma, leucemia, sarcoma histiocítico, plasmocitoma 	Enfarte agudo <ul style="list-style-type: none"> • Hipercoagulação (Doença hepática, doença renal, Cushing) • Neoplasia • Doença cardiovascular 	Neoplasia secundária (Sarcoma, carcinoma, tumores de células redondas)
	Doenças de armazenamento, Amiloidose	Hemangiossarcoma	Granuloma e abscesso

3.Hemangiossarcoma

O hemangiossarcoma é uma neoplasia maligna de origem endotelial, conhecida pelo seu caráter agressivo e altamente metastático, assim como de prognóstico reservado (Linder, 2017).

3.1. Etiologia

As hipóteses propostas para a origem do hemangiossarcoma são a ocorrência de mutações a nível de células endoteliais vasculares diferenciadas, ou uma paragem na diferenciação das células estaminais hemangioblásticas (Lamerato-Kozicki et al., 2006).

A análise imunohistoquímica do hemangiossarcoma demonstra uma expressão elevada de fatores angiogénicos - fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e respetivos recetores; e fator básico de crescimento fibroblástico (FGF). Assim sendo, esta sobre-expressão pode estar relacionada com a proliferação tumoral (Yonemaru, Sakai, Murakami,

Yanai & Masegi, 2006). Uma maior expressão do VEGF foi também observada no plasma de animais com hemangiossarcoma (Clifford et al, 2001).

O VEGF é produzido por várias células (tais como plaquetas, linfócitos, neutrófilos, macrófagos, células musculares lisas, fibroblastos e células tumorais) em resposta à hipoxia, a citocinas inflamatórias, a fatores de crescimento, a hormonas e à mutação de oncogenes (Frenz, Kaup & Neumann, 2014).

Os recetores do VEGF, FGF, do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e da angiopoetina (Tie-1 e Tie-2), fazem parte da família dos recetores da tirosina quinase, importantes na regulação da angiogénese e consequente crescimento e desenvolvimento tumoral (Cherrington, Strawn & Shawver, 2000). A expressão dos dois primeiros verifica-se no endotélio vascular, cuja sinalização culmina na migração e proliferação endotelial; o recetor do PDGF encontra-se ao nível do estroma e pericitos, pelo que desempenha um papel importante na manutenção dos neovasos; e os recetores da angiopoetina localizam-se nos vasos sanguíneos tumorais, com a função de recrutar pericitos e células musculares lisas que sirvam de suporte aos neovasos formados (Cherrington, et al., 2000; Thurston, 2003; Thurston & Gale, 2004).

Em animais com hemangiossarcoma, foram detetadas mutações no gene codificador da proteína homóloga da fosfatase e tensina (PTEN), gene esse não só capaz de inibir a proliferação e ativar a apoptose celular, como também de inibir a angiogénese, pelo que esta poderia ser uma explicação para o potencial metastático característico do hemangiossarcoma (Dickerson et al., 2005).

3.2. Prevalência, fatores de risco e predisposição

A prevalência de hemangiossarcoma é maior na espécie canina relativamente às restantes espécies domésticas (Clifford et al., 2001) e representa aproximadamente 2% dos tumores caninos (Clifford & Lorimier, 2017). Esta neoplasia corresponde a cerca de 5% dos tumores malignos primários não cutâneos, 12 a 21% dos tumores mesenquimatosos, 2,3 a 3,6% dos tumores cutâneos, e 45 a 51% dos tumores malignos esplénicos da espécie canina (Thamm, 2013).

A maior prevalência verifica-se no género masculino e nas raças Pastor Alemão, Labrador e Golden Retriever (Schultheiss, 2004; Gamlem, Nordstoga & Arnesen, 2008). Efetivamente, o hemangiossarcoma foi a causa neoplásica mais frequente de morte nas raças acima referidas (Craig, 2001).

A maioria dos cães afetados apresenta uma idade média variável entre 8 e 13 anos (Smith, 2003). As fêmeas esterilizadas foram associadas a um maior risco de desenvolvimento de hemangiossarcoma esplénico e cardíaco (Prymak et al., 1988; Ware & Hopper, 1999).

Além de o hemangiossarcoma cutâneo dermal ser mais comum em animais com menor pigmentação e pelagem menos densa (Hargis, Ihrke, Spangler & Stannard, 1992), o seu desenvolvimento está também associado à exposição a radiação ultravioleta (Nikula, Benjamin, Angleton, Saunders & Lee, 1992).

3.3. Distribuição primária e metastática

Apesar de qualquer tecido com vasos sanguíneos na sua constituição poder estar na origem de hemangiossarcoma, os quatro locais mais prevalentes são o baço (50-65%), o coração - átrio direito (3-25%), a pele ou tecido subcutâneo (3-17%), e o fígado (5-6%) (Smith, 2003).

É o tumor cardíaco primário e o sarcoma retroperitoneal mais comum em cães (Ware & Hopper, 1999, Liptak et al., 2004). Já a localização primária a nível renal é rara, na ordem dos 0.01% (Locke & Barber, 2006).

O hemangiossarcoma é o tumor esplênico mais frequente na espécie canina (Dobson, 2011), ao qual se aplica a chamada regra dos 2/3, isto é, o tumor maligno é a causa de 2/3 das massas esplênicas, assim como o hemangiossarcoma corresponde a 2/3 dos tumores malignos esplênicos (Clifford & Lorimier, 2017). Aproximadamente 48 a 59% das massas esplênicas foram diagnosticadas como malignas, e 51 a 73% destas massas malignas corresponderam a hemangiossarcoma (Johnson et al., 1989; Spangler & Kass, 1997; Wendelburg et al, 2014).

A metastização é precoce e evidente, em mais de 80% dos animais que se apresentam inicialmente à consulta (Thamm, 2013). Pode ocorrer por via hematogénea ou transcelômica (após ruptura esplênica) (Clifford e Lorimier, 2017). Os órgãos mais frequentemente afetados são o fígado, o omento, o mesentério e o pulmão (Smith, 2003). De referir que o hemangiossarcoma foi o tumor metastático mais prevalente no cérebro (Snyder, Lipitz, Skorupski, Shofer & Van Winkle, 2008).

A observação de lesões hepáticas num animal com hemangiossarcoma esplênico não é patognomónica de metastização hepática. A análise histopatológica revelou que 68% dos fígados macroscopicamente anormais pertencentes a animais com hemangiossarcoma esplênico apresentavam metástases (Clendaniel et al., 2014). As lesões hepáticas com hemorragia ativa, de cor mais escura (preta, castanha ou verde), e a presença de múltiplos nódulos, revelaram valores preditivos positivos de hemangiossarcoma na ordem dos 100, 86 e 55%, respetivamente (Clendaniel et al., 2014). Assim sendo, os animais suspeitos de apresentarem hemangiossarcoma esplênico, nos quais se verifiquem estas alterações hepáticas, têm uma probabilidade elevada de efetivamente terem metástases no fígado.

3.4. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de hemangiossarcoma assenta na análise histopatológica de uma amostra recolhida por biópsia que seja a mais representativa possível da lesão. No caso particular de uma suspeita de hemangiossarcoma esplénico, deve ser obtido o baço inteiro por esplenectomia, não só pelo poder diagnóstico, mas também terapêutico (Thamm, 2013). Deste modo, e tendo em conta que a maioria das massas esplénicas são preenchidas por hematomas, evita-se o diagnóstico incorreto por falta de tecido neoplásico (Smith, 2003).

Todas as lesões observadas no baço e noutros órgãos suspeitos de terem uma natureza neoplásica, devem ser alvo de biópsia e submetidas a análise histopatológica (Smith, 2003).

3.4.1. Quadro clínico de hemangiossarcoma esplénico

A apresentação clínica de hemangiossarcoma esplénico pode ser inespecífica. No entanto, a maioria dos animais apresenta-se com um quadro grave de hemorragia interna, que se traduz por uma notória distensão abdominal e manifestação de sinais associados à perda aguda de sangue (Clifford & Lorimier, 2017). Uma história prévia de episódios de fraqueza intermitentes que se resolvem após 12 a 36 horas pode ser relatada. Esta aparente resolução justifica-se pela reabsorção de sangue (auto-transfusão), capaz de manter um hematócrito elevado (Thamm, 2013). A palpação abdominal revela frequentemente esplenomegália ou sinal de flutuação (North & Banks, 2009).

A observação de mucosas pálidas, intolerância ao exercício, taquicardia e taquipneia são compatíveis com a presença de anemia e consequente menor oxigenação tissular e ativação dos respetivos mecanismos compensatórios (Thrall, 2012).

A ocorrência de arritmias ventriculares, nomeadamente contrações ventriculares prematuras e taquicardia ventricular, está descrita em cães com hemangiossarcoma esplénico. A sua prevalência foi obtida numa percentagem equivalente a 87,5% e associada a um hematócrito pré-cirúrgico inferior e massas esplénicas ruturadas (Marino, Matthiesen, Fox, Lesser & Stamoulis, 1994). Por vezes, estas alterações apenas são observadas após a esplenectomia, pelo que está recomendada a monitorização eletrocardiográfica no período peri e pós-operatório (Knapp, Aronsohn & Harpster, 1993).

As causas possíveis das arritmias são a presença de metástases no miocárdio (nomeadamente ao nível da aurícula direita) hipóxia tissular secundária a anemia ou hipovolémia (no caso de hemorragia interna), e libertação de catecolaminas. Também os anestésicos ou o posicionamento em decúbito dorsal (promotor de compressão da veia cava caudal) estão descritos como fatores predisponentes (Keyes, Rush, Morais & Couto, 1993; Wendelburg et al., 2014). A anemia, seja secundária a hemorragia ou a hemólise microangiopática, compromete a oxigenação do miocárdio (Keyes et al, 1993).

A presença concomitante de hemoperitoneu e uma massa no baço reforça a suspeita de hemangiossarcoma esplênico, diagnóstico esse obtido em 63 a 70% dos casos nos quais essa coexistência se verificou (Pintar, Breitschwerdt, Hardie & Spaulding, 2003; Aronsohn, Dubiel, Roberts & Powers, 2009). A percentagem de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico com uma massa no baço, anemia e hemoperitoneu, é superior ao valor obtido quando os critérios são apenas a presença de massa no baço e anemia, pelo que o hemoperitoneu deve fortalecer a suspeita de hemangiossarcoma esplênico (Hammond & Pesillo-Crosby, 2008). Por outro lado, as massas esplênicas não ruturadas foram maioritariamente diagnosticadas como lesões benignas (Cleveland & Casale, 2016).

O hemoperitoneu não traumático está associado não só a neoplasia intrabdominal benigna ou maligna de órgãos como o baço, fígado, rim, próstata e adrenal, mas também a situações como dilatação/torsão gástrica, torsão hepática ou esplênica e coagulopatia, bem como intoxicação por rodenticidas (Pintar et al., 2003).

A perda de 30 a 40% de sangue total culmina num quadro de choque hipovolémico e uma percentagem superior a 40% é fatal (Mills, 2000). Alguns sinais relacionados com choque hipovolémico são taquicardia, taquipneia, mucosas pálidas, pulso fraco, fraqueza, tempo de repleção capilar lento e colapso (Aronsohn et al., 2009).

A neoplasia (o hemangiossarcoma esplênico como mais prevalente) e o hematoma esplênico são as causas mais frequentes de hemoperitoneu (Pintar et al., 2003). Num grupo de animais com hemoperitoneu, Mallinckrodt & Gottfried (2011) registaram uma prevalência de 80% de hemangiossarcoma esplênico e 56% com uma massa esplênica benigna. Além disso, a sua prevalência em animais com hemangiossarcoma esplênico é superior (70%) (Pintar et al., 2003) ao valor registado para outras localizações primárias do mesmo tumor, como os rins, por exemplo - 14%) (Locke & Barber, 2006).

O prognóstico de hemoperitoneu espontâneo agudo é reservado, não só para os animais sujeitos a laparotomia, mas também para os que não são (Pintar et al., 2003).

3.4.1.1. Quadro clínico de hemangiossarcoma não esplênico

Os animais com hemangiossarcoma cardíaco apresentam sinais de insuficiência cardíaca direita secundariamente a tamponamento cardíaco, tais como intolerância ao exercício, dispneia, distensão abdominal associada a ascite, diminuição de sons cardíacos e pulso jugular (Smith, 2003; Thamm, 2013). A localização primária óssea é responsável por um quadro de claudicação, possibilidade de fratura patológica e dor ou mesmo parésia. Um hemangiossarcoma cutâneo pode chamar a atenção seja por claudicação ou hemorragia da massa (Smith, 2003). Além disso, o hemangiossarcoma foi considerado o tumor secundário

intracraniano mais prevalente, apesar de muitos não exibirem sinais neurológicos (Snyder et al., 2008).

O hemangiossarcoma renal apresenta melhor prognóstico e maior mediana de sobrevivência relativamente às formas viscerais (esplénica, cardíaca e retroperitoneal), caracterizando-se por uma história clínica insidiosa, lesões mais pequenas, e uma menor frequência de casos metastizados e com um quadro de hemoperitoneu no momento de diagnóstico, comparativamente ao hemangiossarcoma esplénico (Locke & Barber, 2006). O hemangiossarcoma cutâneo raramente se apresenta inicialmente num estadio avançado e associado a sinais sistémicos, além de ser reconhecida a associação entre o seu estadiamento e o prognóstico (Ward, Fox, Calderwood-Mays, Hammer & Couto, 1994).

3.4.2. Caracterização macroscópica

Esta neoplasia apresenta-se como uma lesão única, multifocal ou difusa, de tamanho e cor variável (desde branco-acinzentada a vermelha escura ou mesmo roxa), consistência branda ou friável, e repleta de áreas hemorrágicas e necróticas à superfície de corte (Thamm, 2013). As lesões são tipicamente mal circunscritas, não encapsuladas, frequentemente aderentes a órgãos adjacentes e friáveis, pelo que facilmente ruturam, gerando uma hemorragia interna (Thamm, 2013). À superfície de corte observam-se cavidades preenchidas por sangue (Thamm, 2013).

3.4.3. Caracterização microscópica

Os padrões vascular e cavernoso são os mais frequentemente visíveis. Os canais vasculares irregulares e cavernas preenchidas por sangue são delineados por células endoteliais neoplásicas heterogéneas, com graus de diferenciação e morfologia variáveis. Raramente se verifica um padrão sólido, caracterizado por uma forte componente celular neoplásico (Bertazzolo et al., 2005). As células são fusiformes, de núcleo redondo, oval ou pleomórfico, com um nucléolo proeminente, um rácio núcleo/citoplasma baixo e um citoplasma basófilo e muitas vezes vacuolizado; ou fusiformes e monomórficas, de rácio núcleo/citoplasma elevado, núcleo oval a arredondado e nucléolo indistinto (Bertazzolo et al., 2005).

O grau de malignidade histológico é um fator de prognóstico do tempo de sobrevivência, estadiamento esse dependente da diferenciação celular, pleomorfismo nuclear, percentagem de necrose e índice mitótico (Ogilvie, Powers, Mallinckrodt & Withrow, 1996). O índice mitótico elevado é um fator de prognóstico negativo em animais com hemangiossarcoma (Kim et al., 2007; Moore, Rasnick & Frimberger, 2017).

O tempo de sobrevivência não é influenciado de forma significativa pelo padrão de crescimento tumoral (Göritz et al., 2013).

3.4.3.1. Análise citológica e histopatológica

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) pode ser um verdadeiro desafio dada a frequente hemodiluição da amostra. O hemangiossarcoma caracteriza-se por múltiplas áreas hemorrágicas e necróticas resultantes da ruptura de cavidades delineadas por endotélio neoplásico e preenchidas por sangue. A presença de hematomas e quistos pode dar origem a um diagnóstico citológico incorreto de hematoma ou congestão (Johnson et al, 1989).

A punção de lesões visivelmente vascularizadas na ecografia ou suspeitas de corresponderem a um hemangiossarcoma esplênico não está indicada, não só pelo comprometimento da qualidade da amostra frequentemente ofuscada pela presença de sangue, mas também pelo risco de ruptura iatrogénica, disseminação intrabdominal de células tumorais e hemoperitонеu (Couto & O'Keefe, 1987; Dobson, 2011). A ruptura de uma lesão cavitária pode ser fatal, especialmente se existir uma coagulopatia em simultâneo (Fossum, 2013).

O risco e benefício de biopsar uma massa esplênica depende em grande medida do seu aspeto – uma massa única de tamanho significativo com hemorragia ativa ou não, beneficia de uma biópsia excisional (North & Banks, 2009; Dobson, 2011).

A execução de uma biópsia incisional por laparotomia ou ecoguiada, está indicada aquando de esplenomegália difusa e lesões múltiplas nodulares. A PAAF aplica-se no diagnóstico de doença infiltrativa difusa, esplenomegália generalizada ou lesão aparentemente sólida à ecografia (North & Banks, 2009; Dobson, 2011).

As vantagens de uma PAAF são o baixo custo e facilidade de execução, e a avaliação correta do núcleo e citoplasma. Além das complicações a nível de qualidade diagnóstica referidas anteriormente, a preparação do esfregaço provoca disrupção da relação entre as células (Morrison & Denicola, 1993). O valor diagnóstico de uma análise histopatológica é superior, na medida em que permite a avaliação dos elementos estruturais, arquitetura e relação intercelular, importante quando se pretende determinar o caráter invasivo da lesão, além de possibilitar uma posterior análise imunohistoquímica (Morrison & Denicola, 1993).

A concordância entre o resultado citológico e histopatológico varia entre 37,2 a 100% (O'Keefe & Couto, 1987; Ovejero & Hauser, 2007). A equivalência foi também obtida em 10 de 17 amostras de doença esplênica canina (Christensen, Canfield, Martin, Krockenberger, Spielman & Bosward, 2009) e em 8 de 12 amostras de massas/nódulos esplênicos (Cleveland & Casale, 2016).

3.4.4. Distinção entre lesões esplênicas benignas e malignas

O diagnóstico definitivo e diferencial, apenas é possível após análise histopatológica (Smith, 2003). A aparência macroscópica e imagiológica, é frequentemente semelhante entre ambas. Apesar de o tratamento de eleição para massas esplênicas malignas e benignas ser a esplenectomia (Fossum, 2013), a distinção entre uma e outra é importante em termos de prognóstico. Note-se a diferença entre a percentagem de 64% animais que sobreviveram um ano após esplenectomia secundária à presença de massas benignas (Spangler & Culbertson, 1992), relativamente ao valor de 6,25% referente a animais diagnosticados com hemangiossarcoma em estadio I e II (Wood et al. 1998). Os animais que têm uma doença não neoplásica do baço vivem durante um longo período de tempo após esplenectomia (mediana de 36 semanas) ao contrário dos animais com neoplasia esplênica (mediana de 8 semanas) (Johnson et al., 1989).

Não só a ecografia e tomografia com contraste, mas também a ressonância magnética, têm sido mencionadas pela sua capacidade em diferenciar lesões benignas de lesões malignas. A diferenciação é importante na medida em que o detentor muitas vezes opta pela estabilização e posterior cirurgia apenas ciente do risco do seu animal ter um hemangiossarcoma e respetivas implicações, sem saber a verdadeira natureza do problema (Hammond & Pesillo-Crosby, 2008). Infelizmente, o acesso a estas modalidades diagnósticas não é fácil e imediato.

Atualmente, os meios imagiológicos disponíveis e utilizados na prática clínica são a ecografia simples abdominal e cardíaca, e a radiografia simples. Estes permitem o estadiamento de um animal com uma massa esplênica possível de ser um hemangiossarcoma, visando detetar potenciais metástases e rutura tumoral, informação essa que serve de base para informar os detentores relativamente às várias opções terapêuticas e respetivos prognósticos, dados esses presentes em diversos artigos, muitos deles referenciados ao longo desta dissertação, tal como o de Wendelburg et al. (2015).

O estadiamento clínico de hemangiossarcoma (estádios I, II e III) apresenta-se ilustrado na tabela 2 e é um fator de prognóstico do tempo de sobrevivência (Wendelburg et al., 2015). A tabela 3 representa o estadiamento do hemangiossarcoma esplênico canino, baseado na tabela 2.

Tabela 2 – Estadiamento clínico de hemangiossarcoma (adaptado de Thamm, 2013)

Tumor primário (T)	
T0	Sem evidência de tumor
T1	Tumor <5cm de diâmetro e confinado num local
T2	Tumor ≥5cm ou ruturado: invasão de tecidos subcutâneos
T3	Tumor invade estruturas adjacentes, incluindo músculo
Linfonodos regionais (N)	
N0	Sem envolvimento de linfonodos regionais
N1	Com envolvimento de linfonodos regionais
N2	Envolvimentos de linfonodos distantes
Metastização à distância (M)	
M0	Sem evidência de metastização
M1	Com evidência de metastização
Estadio	
I	T0 ou T1, N0, M0
II	T1 ou T2, N0 ou N1, M0
III	T2 ou T3, N0, N1 ou N2, M1

Tabela 3 – Estadiamento clínico de hemangiossarcoma esplênico canino (adaptado de North & Banks, 2009)

Estadio	Extensão da doença
I	Confinado ao baço
II	Rutura esplênica, sem evidência de metástases
III	Rutura esplênica, com evidência de metástases

A ocorrência de anemia, trombocitopenia e eritrócitos morfologicamente alterados; ou de hemoperitoneu, valor das proteínas totais e contagem de plaquetas diminuído; ou ainda de anemia, rutura esplênica, e esplenomegália (Johnson et al, 1989; Hammond & Crosby, 2008; Mallinckrodt & Gottfried, 2011), são consideradas úteis na diferenciação de massas esplênicas benignas de massas esplênicas malignas.

Os cães com anemia, metarrubricitos, eritrócitos morfologicamente anormais, ou rutura esplênica, têm uma maior probabilidade de ter uma doença esplênica neoplásica do que não neoplásica. Considerando estes quadros sintomatológicos, a rutura é um forte fator preditivo

da natureza neoplásica, tendo em conta que 95% dos cães com rutura evidenciaram neoplasia como diagnóstico. No entanto, a sua especificidade é baixa, já que 43% dos animais com neoplasia esplénica não apresentaram rutura do órgão (Johnson et al., 1989).

3.4.5. Diagnóstico laboratorial

3.4.5.1. Hemograma e Bioquímicas

Normalmente, o hemograma reflete alterações relacionadas com anemia regenerativa, incluindo anisocitose, policromasia e reticulocitose (Ng & Mills, 1985).

A anemia, tipicamente detetada em animais com hemangiossarcoma esplénico, pode ser secundária à hemorragia interna que uma rutura tumoral origina e/ou à destruição dos eritrócitos que circulam nos vasos tumorais anormais – hemólise microangiopática (Smith, 2003). A anemia pode não ser detetada nas primeiras horas após o início da hemorragia graças à contração esplénica e função de reserva que o baço apresenta (Tvedten, 2010) e à reabsorção de sangue (auto-transfusão) (Pintar et al., 2003). No entanto, rapidamente não só o hematócrito, mas também as proteínas totais diminuem, dada a hemodiluição resultante da translocação de fluido intersticial para o espaço intravascular (Mills, 2000; Kerr, 2002).

O hematócrito é menor em cães com hemoperitонеu devido a hemangiossarcoma do que devido a outra causa. No entanto, a diferença observada nestes casos não foi considerada significativa (Wong, Gonsalves, Huber, Rich & Strom, 2015).

A leucocitose neutrofílica é frequentemente registada, e pode ser secundária a stress, necrose tumoral e/ou como parte de uma resposta inespecífica da medula à anemia presente (Smith, 2003; Kim et al., 2007).

A trombocitopénia também é um achado laboratorial comum, devida a hemorragia (por consumo), sequestro de plaquetas na rede microvascular tumoral ou coagulação vascular disseminada (Dobson, 2011). Verificou-se que uma contagem de plaquetas $<90000/\mu\text{l}$ (Hammond & Pesillo-Crosby, 2008) ou $\leq 83000/\mu\text{l}$ (Wong et al., 2015) tem um valor preditivo positivo e elevado para hemangiossarcoma. 75% de animais com hemangiossarcoma esplénico apresentaram trombocitopenia (Hammer et al., 1991; Kim et al., 2007). Já uma hemorragia de vários dias está associada a trombocitose, seja secundária a contração esplénica, seja por estimulação medular (Mills, 2000).

A deteção de leucocitose com neutrofilia e trombocitopénia iniciais, assim como a duração dos sinais clínicos, são fatores que afetam de forma negativa e significativa o prognóstico de um animal com hemangiossarcoma esplénico. Efetivamente, a neutrofilia e a trombocitopénia triplicam a probabilidade de o animal morrer (Kim et al., 2007).

Algumas alterações morfológicas eritrocitárias (cor, tamanho, forma, disposição no esfregaço e estruturas associadas) são típicas de determinadas doenças, devendo por isso ser interpretadas de acordo com os dados quantitativos fornecidos pelo hemograma (Thrall, 2012). A observação de esquizócitos e acantócitos no esfregaço de sangue periférico, de um animal com hemangiossarcoma esplênico, é frequente (Dobson, 2011), na ordem dos 80 e 90%, respetivamente (Ng & Mills, 1985).

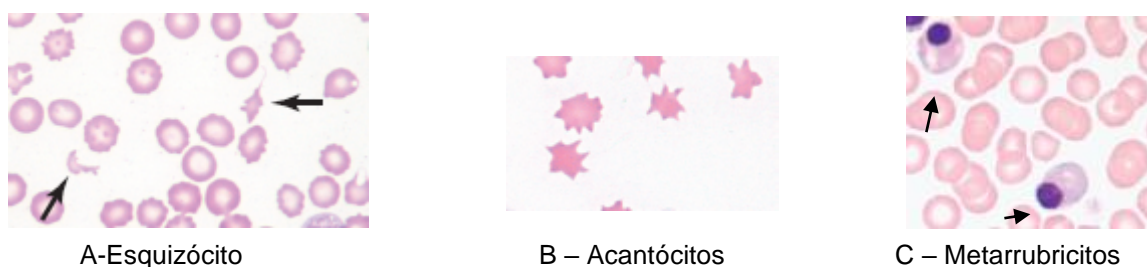
A hemólise microangiopática traduz-se pela presença de fragmentos de eritrócitos (esquizócitos) que sofreram distorção e disrupção pelos depósitos de fibrina presentes nos vasos e pela arquitetura vascular tumoral anormal. A anemia hemolítica microangiopática foi reportada em 50% de animais com hemangiossarcoma esplênico, tanto direta, como indiretamente, como no caso de animais com coagulação vascular disseminada (Hammer, Couto, Swardson & Getzy, 1991). Laboratorialmente, define-se por um hematócrito diminuído, reticulocitose, presença de metarrubricitos, esquizócitos e trombocitopenia (Johnson et al., 1989). A observação de esquizócitos foi reportada em 46% de animais com hemangiossarcoma esplênico (Hammer et al., 1991)

Os acantócitos são eritrócitos espiculados de superfície irregular, repletos de projeções com um comprimento e diâmetro variável, cujo mecanismo de formação em animais com hemangiossarcoma é desconhecido (Thrall, 2012). A sua presença na ordem dos 50% tem sido observada (Hirsch, Jacobsen & Mills, 1981), mas não é patognomónica de hemangiossarcoma (Warry, Bohn, Emanuelli, Thamm & Lana, 2013).

Na anemia regenerativa, seja secundária a hemorragia tumoral, seja devido à hemólise previamente referida, está presente um número elevado de metarrubricitos. Em ambos os casos, verifica-se a perda de eritrócitos funcionais e consequente hipoxia que, por sua vez, estimula uma resposta medular. Também o mau funcionamento do baço justifica a elevada prevalência destas células em circulação, pois este órgão não é capaz de exercer a sua função de remover eritrócitos alterados da circulação (Smith, 2003).

A figura 4 ilustra várias alterações morfológicas eritrocitárias associadas a hemangiossarcoma.

Figura 4 – Alterações morfológicas eritrocitárias associadas a hemangiossarcoma (adaptado de Valenciano, Cowell, Rizzi & Tyler, 2013)



A hipoproteinémia, secundária a perda de sangue por rutura tumoral (Thrall, 2012), e uma elevação ligeira das enzimas hepáticas podem ser registadas em animais com hemangiossarcoma (Thamm, 2013). De referir que este último achado bioquímico pode refletir a infiltração do fígado pela neoplasia, ou a hipoxia resultante do estado anémico que o animal apresenta (Smith, 2003).

3.4.5.2. Testes de coagulação

A maioria dos quadros clínicos são marcados por alterações do tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, número de plaquetas, tempo de coagulação ativado, concentração de fibrinogénio e produtos de degradação do fibrinogénio (Thamm, 2013). No caso de rutura tumoral, os tempos de coagulação estão elevados e a contagem de plaquetas apresenta-se diminuída por consumo (Pintar et al., 2003).

O hemangiossarcoma é dos tumores malignos onde se regista uma maior prevalência de cães com coagulação intravascular disseminada (Maruyana et al., 2003). Esta síndrome caracteriza-se pela formação excessiva de trombina e plasmina, provocando o consumo de plaquetas, fatores de coagulação e inibidores das proteases, além da hiperfibrinólise secundária. Assim sendo, verifica-se tendência para microtrombose e hemorragia (Maruyama et al., 2003). A sua manifestação clínica depende do contra-balanço entre a coagulação e a fibrinólise, e varia entre um quadro trombótico obstrutor da microcirculação, com consequente falência de órgãos; e um quadro hemorrágico associado à presença de petéquias, equimoses, hematúria e hemorragia pelas aberturas naturais (Holloway, 2000).

A presença de coagulação intravascular disseminada foi registada em 50% dos animais com hemangiossarcoma esplénico, dos quais 25% morreram devido a essa condição (Hammer et al., 1991). De referir que este valor pode estar falsamente diminuído, tendo em conta os 33% que, entretanto, foram eutanasiados

A coagulação intravascular disseminada, síndrome frequente em cães com hemangiossarcoma, está associada a trombocitopenia, valores elevados da protrombina, do

tempo de tromboplastina parcial e dos produtos de degradação da fibrina; e diminuição dos níveis de fibrinogénio e antitrombina III (Smith, 2003). Outros achados que reforçam o seu diagnóstico são uma hipofibrinogenemia, presença de esquizócitos e a observação histológica de microtrombos de fibrina (Holloway, 2000).

3.4.5.3. Análise do líquido de derrame

O hemoperitoneu verifica-se após rutura de um hemangiossarcoma visceral como o esplénico, sendo o líquido de aspeto sanguinolento não coagulado, cuja análise citológica revela a presença de componentes típicos do sangue periférico ou macrófagos com hemossiderina, no caso de uma hemorragia mais antiga (Smith, 2003). O valor do hematócrito do líquido de derrame, obtido por abdominocentese, será igual ou superior ao do sangue periférico.

A distinção entre um derrame pericárdico idiopático ou secundário a um processo neoplásico não é possível, na medida em que ambos são hemorrágicos. No entanto, um pH ≥ 7 pode ser indicativo de malignidade (Edwards, 1996), assim como a presença de células neoplásicas demonstrou ser diagnóstica de hemangiossarcoma cardíaco em 25% dos animais (Berg, Wingfield & Hoopes, 1984).

A análise citológica do líquido de derrame não é um meio fiável para determinar a origem neoplásica ou não neoplásica (Sisson, Thomas, Ruehl & Zinkl, 1984). Embora possam ser visualizadas células neoplásicas, estas encontram-se fortemente diluídas (Thamm, 2013)

3.4.6. Diagnóstico imagiológico

3.4.6.1. Radiografia

Numa projeção ventrodorsal, a cabeça do baço adquire uma forma triangular visível no lado esquerdo, caudolateral à região fúndica gástrica e cranio lateral ao rim esquerdo. A restante extensão deste órgão prolonga-se de forma adjacente à parede abdominal lateral esquerda ou mais medialmente (Larson, 2013).

Numa projeção latero-lateral, a opacidade de tecido mole triangular, referente à extremidade proximal do baço, localiza-se dorsal e caudal ao estômago, ao passo que a extremidade distal tipicamente triangular se situa imediatamente caudal e ligeiramente ventral ao fígado e piloro (Larson, 2013). A visualização desde órgão é superior numa projeção lateral direita (Tillson, 2003).

Não existe um critério objetivo que permita diagnosticar radiograficamente uma esplenomegália, seja ela generalizada ou localizada. O arredondamento das margens e o deslocamento das vísceras abdominais adjacentes são apenas referências. Numa projeção

latero-lateral, uma massa no corpo ou extremidade distal do baço promove um desvio dorsal e caudal do jejuno; numa projeção ventrodorsal, o desvio é para o lado direito ou esquerdo. Se o aumento de volume for ao nível da cabeça do baço, verifica-se um deslocamento cranial do estômago (Larson, 2013).

Um hemoperitoneu traduz-se radiograficamente por uma perda de detalhe/contraste abdominal e observação de uma radiopacidade de tecido mole homogénea (Frank, P. M., 2013).

A sensibilidade do raio-x para a deteção de hemangiossarcoma pulmonar e cardíaco foi avaliada na ordem dos 78% e 47%, respetivamente (Holt, Van Winkle, Schelling & Prymak, 1992; North & Banks, 2009). A pesquisa de eventuais metástases deve anteceder qualquer decisão terapêutica, uma vez que a sua presença altera o prognóstico (Thamm, 2013). O padrão metastático pulmonar de hemangiossarcoma caracteriza-se predominantemente por pequenos nódulos de tamanho variável, na sua maioria de limites mal definidos, e distribuídos de forma dispersa (Hammer, Bailey & Sagartz, 1993). Os animais com hemangiossarcoma cardíaco e hemopericárdio apresentam tipicamente uma silhueta cardíaca globóide, com ou sem distensão da veia cava caudal (Thamm, 2013).

3.4.6.2. Ecocardiografia

No diagnóstico de derrame pericárdico e para a pesquisa de alguma massa a nível do átrio direito, massa essa que não deve ser confundida com sangue coagulado, é importante realizar uma ecocardiografia. A ausência de uma massa não descarta a possibilidade de hemangiossarcoma cardíaco, assim como a sua presença não é patognomónica (Thamm, 2013).

A pesquisa de metástases cardíacas está indicada num animal suspeito de ter um hemangiossarcoma esplénico quer pela presença de hemoperitoneu, quer pela deteção prévia de uma massa esplénica. Esta coexistência verificou-se em 24% dos animais (Waters, Caywood, Hayden & Klausner, 1988).

3.4.6.3. Ecografia

A aparência ecográfica normal do baço traduz-se por uma cápsula hiperecogénica, um parênquima homogéneo e de ecogenicidade superior ao córtex renal, e uma veia esplénica visível como uma estrutura anecogénica (Tillson, 2003).

Apesar das radiografias abdominais permitirem detetar um efeito de massa, esplenomegália ou derrame intrabdominal, a ecografia é considerada superior na visualização do abdómen e evidência de metastização, até porque muitos animais com hemangiossarcoma esplénico

terão derrame aquando da sua apresentação clínica, o que diminui o detalhe de uma radiografia, mas não de uma ecografia (Thamm, 2013; Dobson, 2011).

A visualização ecográfica de nódulos hepáticos não quer dizer que estes correspondam a metástases, pois pode tratar-se de um processo benigno, tal como uma hiperplasia nodular (Pintar et al., 2003).

Este meio de diagnóstico fornece informação acerca da arquitetura das massas esplénicas comparativamente com o parênquima normal. As massas correspondentes a um hemangiossarcoma esplénico estão associadas a um padrão misto de ecogenecidade, cujas áreas de ecogenecidade inferior correspondem à presença de sangue, contrastando com o aspeto homogéneo e mais hiperecogénico do baço normal (Wrigley, Park, Konde & Lebel, 1988; Dobson, 2011). Uma lesão em alvo (halo hipoecogénico e um centro hiperecogénico) também está descrita em casos de hemangiossarcoma, assim como noutras lesões, incluindo de carácter benigno (Cuccovillo & Lamb, 2002).

A ecografia por si só é pouco útil na distinção entre lesões benignas e malignas, dada a aparência similar de um hemangiossarcoma relativamente a outras lesões, como um hemangioma ou hematoma (North & Banks, 2009). Assim sendo, outros meios de diagnóstico têm sido referenciados na distinção entre tumores benignos e malignos, tais como a ecografia e tomografia computadorizada com contraste, e a ressonância magnética.

A ecografia com contraste baseia-se na injeção endovenosa de um contraste de núcleo gasoso rodeado por uma camada fosfolipídica. Assim obtém-se uma menor solubilidade e consequente maior estabilidade a nível vascular sob a forma de microbolhas, permitindo avaliar a perfusão de determinadas lesões comparativamente ao restante parênquima do órgão. Aquando da exposição a uma onda ultrassonográfica, as microbolhas refletem mais que os tecidos em redor, ou seja, é maior a ecogenecidade. As lesões benignas são isoecogénicas e têm um padrão de perfusão semelhante ao parênquima normal, sendo a arquitetura vascular similar em ambas. As lesões malignas apresentam-se hipoecogénicas em relação ao tecido esplénico normal (Ohlerth et al., 2008; Rossi, Leone, Vignoli, Laddaga & Terragni, 2008). Esta técnica não distingue um hemangiossarcoma esplénico de um hematoma, mas possibilita a distinção entre lesão hepática benigna e metastática em cães com hemangiossarcoma esplénico (Ivančić, Long & Seiler, 2009).

2.4.6.4. Tomografia Computorizada e Ressonância Magnética

A tomografia computadorizada com contraste baseia-se no mesmo raciocínio que a ecografia com contraste, pelo que lesões malignas estão associadas a valores inferiores, em unidades de *Hounsfield* aos das lesões benignas, tendo sido proposto um valor de diferenciação

equivalente a 55 unidades de *Hounsfield* – abaixo desse valor, a lesão seria considerada como maligna (Fife, Samii, Drost, Mattoon & Hoshaw-Woodard, 2004).

Em 94% dos casos (cuja confirmação diagnóstica foi obtida após análise histopatológica), também a ressonância magnética distinguiu corretamente lesões esplênicas e hepáticas benignas e malignas, com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 90% (Clifford et al., 2004). As lesões correspondentes a hemangiossarcoma apresentaram-se mais hipodensas do que lesões benignas, tais como hematomas e hiperplasia nodular benigna (Clifford et al., 2004).

3.4.7. Outros meios de diagnóstico

A análise imunohistoquímica para detetar a presença do antígeno relacionado com o fator de *Von Willebrand* ou o CD31, revelou-se útil para confirmar a origem endotelial e o diagnóstico de hemangiossarcoma, tendo em conta que ambos os antígenos são produzidos pelas células endoteliais (Thamm, 2013). A marcação para o antígeno CD31 demonstrou ser mais intensa e com menor marcação de fundo que a anterior (Ferrer et al., 1995). Outro exemplo é a proteína claudina-5, presente nas junções interendoteliais, e associada a uma maior sensibilidade que as duas análises anteriores (Jakab et al., 2009).

A marcação positiva para ambos foi observada em 100% dos hemangiomas, mas não na totalidade dos hemangiossarcomas (talvez pela pobre diferenciação). Assim sendo, uma marcação positiva confirma a ocorrência de um tumor vascular, apesar de não diferenciar a origem benigna de maligna. Já uma marcação negativa não permite a exclusão desta neoplasia (Von Beust et al., 1988; Ferrer, Fondevila, Rabanal & Vilafranca, 1995). Além disso, nenhum deles distingue células endoteliais dos vasos sanguíneos das pertencentes aos vasos linfáticos (Linder, 2017).

O desenvolvimento tumoral está dependente da angiogénese, pelo que a presença de fatores como o VEGF, a angiopoetina-2, e respetivos recetores a nível das células endoteliais, pode ser útil no diagnóstico da doença (Göritz et al., 2013). O valor sérico do VEGF é superior em animais com massa esplênicas, apesar de não existir uma diferença significativa para os valores deste parâmetro entre cães com hemangiossarcoma e hematoma esplênico (Frenz et al. 2014).

Outros parâmetros são promissores para o diagnóstico de hemangiossarcoma, tais como a medição da glicoproteína alfa-1 sérica, da região lipocalina do colagénio XXVII alfa-1 e da atividade da timidina quinase (Thamm, 2013). A glicoproteína alfa-1, produzida maioritariamente pelo fígado em resposta a citocinas pro-inflamatórias, apresenta-se elevada em situações inflamatórias, tal como doenças infecciosas, algumas doenças imunomediadas, trauma e alguns tumores malignos (carcinoma, sarcoma e linfoma). O

hemangiossarcoma foi o sarcoma onde um valor mais elevado foi registado (Yuki, Machida, Sawano & Itoh, 2011).

A concentração sérica de um fragmento do colagénio XXVII alfa-1 (presente no osso, pele, tendões, ligamentos, córnea e vasos sanguíneos) apresenta-se aumentada e em valores mais elevados em animais com hemangiossarcoma, comparativamente com animais diagnosticados com linfoma, osteossarcoma, carcinoma e doença inflamatória (cistite, pneumonia, enterite, artrite). O seu valor diminui após esplenectomia e quimioterapia, e aumenta numa situação de recorrência, reforçando a hipótese inicial de que este marcador pode refletir a presença desta neoplasia em particular, e ser útil não só no diagnóstico, mas também na monitorização da doença. A sua concentração pode ser influenciada pelo estadió, na medida em que um valor superior verifica-se aquando da presença de metástases (Kirby et al., 2011).

A timidina quinase é uma enzima citosólica envolvida na síntese de ADN, mais concretamente na biossíntese de timidina, cuja expressão se limita a células em proliferação, tais como as neoplásicas (Thamm et al., 2011). Num grupo de animais com um quadro de hemoperitонеu e massa esplénica de forma concomitante, o valor da timidina quinase demonstrou ser superior nos casos correspondentes a uma lesão maligna esplénica, relativamente aos observados nos casos de lesão benigna, pelo que pode ser útil na exclusão de uma neoplasia esplénica num animal com hemoperitонеu. No entanto, não se verifica uma diferença significativa entre cães com hemangiossarcoma e cães com outro processo maligno a nível do baço (Thamm et al., 2011).

3.5. Tratamento

Antes de qualquer procedimento, nomeadamente o cirúrgico, o animal com hemangiossarcoma deve ser estabilizado. A terapêutica transfusional está indicada para corrigir não só a desidratação, os desequilíbrios eletrolíticos e ácido-base, mas também potenciais alterações nos parâmetros de coagulação e hematológicos graves (Thamm, 2013). Assim, um valor de hematócrito <20% ou uma concentração de hemoglobina <5-7 g/dl num cão hidratado pode justificar uma transfusão, assim como um animal que se apresente com um quadro de coagulação vascular disseminada pode beneficiar da administração de plasma, com ou sem heparina (Fossum, 2013).

Atualmente, os tratamentos disponíveis para animais diagnosticados com hemangiossarcoma são a esplenectomia e a esplenectomia associada a quimioterapia (Sorenmo et al., 2007). A mediana de sobrevivência dos animais sujeitos a quimioterapia após a esplenectomia é superior à verificada nos animais apenas sujeitos a esplenectomia (Sorenmo et al. 2000).

A administração de quimioterapia convencional (citotóxica), com doxorubicina, e a metronômica (anti-angiogénica), com ciclofosfamida, pode ser simultânea ou sequencial, apesar de a primeira opção tirar partido do efeito sinérgico. A combinação das duas é mais eficaz do que qualquer uma de forma isolada, embora a sua administração simultânea possa exacerbar os efeitos secundários hematológicos e gastrointestinais (Wendelburg et al., 2015).

O hemangiossarcoma caracteriza-se pelo seu carácter agressivo e rápida metastização, razão pela qual se verifica um curto espaço de tempo (mediana de 31 dias) entre a descontinuação da quimioterapia e a morte dos animais (Wendelburg et al., 2015). Assim sendo, a administração de quimioterapia de manutenção prolongada em animais com hemangiossarcoma esplénico é plausível (Wendelburg et al., 2015).

3.5.1. Esplenectomia

A esplenectomia é o tratamento de eleição inicial em cães com hemangiossarcoma esplénico e deve ser efetuada de forma cuidadosa, de modo a evitar uma rutura iatrogénica do baço (Thamm, 2013). Este procedimento está indicado quando há suspeita ou confirmação de neoplasia, de torção esplénica, de rutura ou de esplenomegália associada a doença infiltrativa (Tillson, 2003).

Algumas complicações pós-cirúrgicas são a ocorrência de arritmias ventriculares e hemorragia interna (Thamm, 2013). Também se podem verificar alterações dos parâmetros hematológicos e da morfologia celular, assim como um maior risco de infeção bacteriana, hemoparasitismo e sepsis, por exemplo (Tillson, 2003).

A tabela 4 resume alguns valores de medianas de sobrevivência de animais diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico sujeitos apenas a esplenectomia.

Tabela 4 – Sobrevida de cães com hemangiossarcoma esplênico após esplenectomia

Tratamento	Amostra	Estadio	Mediana de sobrevivência (dias)	Referências
Esplenectomia	HE	I + II + III	19 48 56 86 104	Prymak et al., 1988 Wendelburg et al., 2015 Johnson et al., 1989 Wood et al., 1998; Kim et al., 2007 Cleveland & Casale, 2016
		I	91 165	Johnson et al., 1989 Wendelburg et al., 2015
		II	60 168	Wendelburg et al., 2015 Johnson et al., 1989
		III	27 56	Wendelburg et al., 2015 Johnson et al., 1989

HE: Hemangiossarcoma esplênico

A existência ou não de uma associação significativa entre o estadiamento e a sobrevivência após esplenectomia é uma questão controversa – uns afirmam que não (Johnson et al., 1989; Hammer et al., 1991; Wood et al., 1998), outros afirmam que sim. A metastização inicial foi associada a um menor tempo de sobrevivência (Göriz et al., 2013), assim como se verificou que nenhum animal em estadio III atingiu um ano de sobrevivência pós-cirúrgico – a maioria foi sujeita a eutanásia secundariamente à hemorragia de lesões metastáticas que, entretanto, se desenvolveram (Wendelburg et al., 2015). Tendo em conta o caráter agressivo e a metastização precoce que caracterizam o hemangiossarcoma, o tempo entre a esplenectomia e o início do protocolo quimioterápico deve ser o mais reduzido possível.

A mediana de sobrevivência é maior em animais com hemangiossarcoma esplênico sem hemoperitôneo, comparativamente aos que apresentaram este quadro de ruptura tumoral, pelo que foi concluído um melhor prognóstico em estadios mais precoces (Prymak et al., 1985; Cleveland & Casale, 2016).

Alternativamente à laparotomia, a esplenectomia pode ser feita por laparoscopia. É uma opção em animais clinicamente estáveis, tais como aqueles diagnosticados com massas

esplénicas ≤ 5 cm, sem hemoperitoneu associado. A presença de hemoperitoneu é uma contra-indicação, não só pelo comprometimento da visibilidade, mas também pela necessidade de rapidamente controlar a hemorragia ativa (Collard et al., 2009; Cleveland & Casale, 2016). As vantagens são a rápida recuperação e retorno à atividade diária normal; e menores morbidade, trauma cirúrgico, dor pós-operatória e tempo de hospitalização. No entanto, podem verificar-se algumas complicações, tais como uma hemorragia incontrolável (situação que implica a conversão da laparoscopia numa laparotomia), disseminação de células tumorais, contaminação da incisão, entre outras (Collard, Nadeau, & Carmel, 2009).

3.5.1.1. Fatores de risco e prognóstico

A presença de anemia e trombocitopenia graves pré-operatórias e a ocorrência de arritmias ventriculares no período intra-cirúrgico, constituíram fatores de risco para a morte peri-operatória de cães sujeitos a esplenectomia devido à presença de massa esplénica, das quais 42,3% correspondiam a hemangiossarcoma. Efetivamente, um valor de hematócrito $<30\%$ e a ocorrência de arritmias ventriculares duplicam a probabilidade de morte, probabilidade essa que aumenta aproximadamente 6% por cada decréscimo de 10.000 plaquetas/ μL (Wendelburg et al., 2014).

As causas mais frequentes de morte peri-operatória são as síndromes trombóticas (como a coagulação vascular disseminada, trombose do sistema porta e tromboembolismo pulmonar) e a hemorragia de lesões tumorais (Wendelburg et al., 2014). Nesse sentido, os animais cujo diagnóstico da massa esplénica seja hemangiossarcoma têm uma maior probabilidade de morrer no período peri-cirúrgico, pois tanto a lesão primária como as metastáticas facilmente ruturam.

3.5.2. Quimioterapia

A quimioterapia pós-cirúrgica surgiu como uma tentativa de prevenir ou atrasar o processo de metastização (Thamm, 2013). Ao longo do tempo, têm sido avaliados vários protocolos no sentido de aumentar o tempo de sobrevivência e o tempo livre de doença. Uma vez conhecido o carácter agressivo do hemangiossarcoma, o tempo que medeia a cirurgia e o início da quimioterapia deve ser reduzido ao máximo (Wendelburg et al., 2015).

Este tratamento adjuvante assenta no efeito tumoricida que várias substâncias apresentam. Geralmente, a combinação de vários compostos quimioterápicos culmina em tempos de sobrevivência mais prolongados e tempos de remissão superiores em relação a uma quimioterapia que recorre apenas a um fármaco, na medida em que é maior a probabilidade de se prevenir ou atrasar o desenvolvimento de clones multi-resistentes (Couto, 2014b). A combinação terapêutica deve incluir substâncias com uma ação eficaz no tumor em

questão, mas que tenham mecanismos de ação diferentes e toxicidades individuais que não sejam cumulativas (Couto, 2014b).

A eficácia da quimioterapia é influenciada pela dose, biodisponibilidade dos fármacos e resistência aos mesmos. A resistência pode ser classificada como aparente (inadequada absorção, frequência de administração e dosagem, ou interações medicamentosas), ou absoluta/adquirida, relacionada com os mecanismos de proteção que as próprias células adquirem no sentido de, por exemplo, aumentar a excreção e diminuir a ativação dos fármacos (Sorenmo et al., 2004). Em último caso, a resistência aos fármacos é a causa de falha terapêutica, seja ela intrínseca ou adquirida ao longo do tempo (North & Banks, 2009).

Quanto maior é a massa tumoral, maior é o número de células e a probabilidade de existirem linhas celulares que adquiram resistência, pelo que a sua erradicação pode implicar a associação de vários fármacos em doses eficazes. É, portanto, um desafio, dada a heterogeneidade de populações celulares que a maioria das neoplasias pode apresentar a certo ponto (DeVita, 1983). Efetivamente, quanto menor é a massa tumoral, maior é a fração de crescimento (proporção de células em proliferação), e menor é o tempo de duplicação (tempo necessário para a massa duplicar de tamanho), pelo que é mais facilmente erradicada do que uma massa tumoral de maior dimensão (Couto, 2014b).

Os quimioterápicos classificam-se de acordo com o seu mecanismo de ação. Tanto os agentes alquilantes (como a ciclofosfamida, a ifosfamida e a dacarbazina), como os antibióticos antitumorais (como a doxorrubicina e a epirrubicina) exercem o seu efeito ao nível da fase S do ciclo celular, ao inibirem a replicação do ADN (Gustafson & Page, 2013). Já a vincristina, substância inibidora da polimerização da tubulina, atua na fase M do ciclo celular (Gustafson & Page, 2013).

3.5.2.1 Reações secundárias

As células-alvo da quimioterapia são as que apresentam uma rápida divisão celular, pelo que não só células neoplásicas, mas também células normais de alto índice mitótico e fração de crescimento, tais como as da medula e do trato gastrointestinal, são atingidas. Assim sendo, é frequente ocorrer mielossupressão e toxicidade gastrointestinal associada aos vários protocolos de quimioterapia (Couto, 2014a).

Os tempos de produção e de circulação dos eritrócitos são 7 e 120 dias; para as plaquetas são 3 e 4-6 dias; e para os granulócitos são 6 dias e 4-8 horas, respetivamente (Couto, 2014a). Nesse sentido, normalmente ocorre primeiro uma neutropenia, seguida de uma trombocitopenia (North & Banks, 2009). Geralmente, o nadir da neutropenia é atingido 7-10 dias após a quimioterapia e a recuperação acontece num período até 4-5 dias depois. A anemia raramente é significativa e muitas vezes nem se verifica – se tal acontecer, apenas

será a longo prazo, 3 a 4 meses após o início da quimioterapia (Couto, 2014). Geralmente não há o risco de ocorrência de hemorragia espontânea, situação essa associada a valores inferiores a 30.000 plaquetas/ μ l (Couto, 2014a).

A contagem de neutrófilos deve ser realizada antes de cada sessão, a qual deve ser adiada quando o valor for inferior a 1500 neutrófilos/ μ l (Vail, 2009). A antibióterapia está indicada se o valor for inferior a 1000 neutrófilos/ μ l, dado o risco de sepsis. Já a coexistência de uma contagem inferior a 500 neutrófilos/ μ l e de um quadro febril requer a hospitalização do animal (Gustafson & Page, 2013). A sepsis num animal sujeito a quimioterapia justifica-se pela afeção da medula e das células do trato gastrointestinal, pelo que facilmente se verifica uma translocação bacteriana sem que haja um número suficiente de neutrófilos em circulação para conter estes microrganismos (Couto, 2014a).

A toxicidade gastrointestinal, característica de todos os compostos quimioterápicos, manifesta-se por episódios de vômito, frequentemente auto-limitantes, e que podem ser prevenidos ou controlados através da administração de um anti-emético (maropitant, por exemplo). Também há a possibilidade de ocorrência de diarreia, normalmente transitória e resolúvel apenas com dieta branda, apesar de em casos mais graves e persistentes se justificar a hospitalização, fluidoterapia e antibióterapia (North & Banks, 2009). Apesar de ser menos comum, está descrita a possibilidade de ocorrência de gastroenterocolite associada à administração de doxorrubicina, e caracterizada por uma diarreia hemorrágica, associada ou não a vômito, 3 a 7 dias após a administração do fármaco (Couto, 2014a).

A toxicidade dermatológica traduz-se numa necrose tissular, aquando da extravasão de doxorrubicina, epirubicina ou vincristina (Couto, 2014a); atraso no crescimento do pêlo ou alopecia (com uma maior prevalência em determinadas raças e nas que têm um pêlo de crescimento contínuo), particularmente associada à administração de doxorrubicina e ciclofosfamida (North & Banks, 2009); e hiperpigmentação, manifestação rara mas descrita em animais sujeitos ao tratamento com doxorrubicina (Couto, 2014a). A vincristina pode ser causa de uma neuropatia periférica ou íleo parálítico (North & Banks, 2009).

A cardiotoxicidade associada à doxorrubicina traduz-se na ocorrência de arritmias (forma aguda) ou cardiomiopatia dilatada (forma cumulativa crónica). Assim, os animais devem ser avaliados ecocardiograficamente antes de iniciarem a quimioterapia, e monitorizados posteriormente com vista a serem detetadas alterações na contratilidade do miocárdio (avaliada pela fração de encurtamento) (Couto, 2014a). O tempo de administração por infusão da doxorrubicina deve ser prolongado, no sentido de diminuir o pico de concentração plasmática, diretamente relacionado com a toxicidade (Mauldin et al., 1992).

Apesar de qualquer substância poder originar uma reação de hipersensibilidade, está relatada maior prevalência de casos associados à doxorrubicina. No entanto, a sua

ocorrência pode ser prevenida pela administração prévia de um anti-histamínico (North & Banks, 2009). Tipicamente, esta reação manifesta-se por um quadro de urticária, eritema, vômito ou diarreia, e raramente colapso associado a hipotensão (Couto, 2014a).

Já no que respeita à ciclofosfamida, o efeito adverso mais conhecido é a cistite hemorrágica estéril (manifestada por hematúria, polaquiúria e disúria), também verificado aquando da administração de ifosfamida, problema que pode ser prevenido através da administração concomitante de 2-mercaptoetano sulfonato. Esta substância associa-se à acroleína urotóxica, resultante do metabolismo destes agentes quimioterápicos, formando um complexo inerte (Rassnick et al., 2000). Também a administração de furosemida e prednisolona, que promovem uma diurese forçada e um efeito anti-inflamatório, respetivamente, podem diminuir a sua prevalência (Couto, 2014a).

3.5.2.2. Compostos quimioterápicos convencionais

Os protocolos quimioterápicos a utilizar após esplenectomia são vários. Na tabela 5 apresentam-se as medianas do tempo de sobrevivência associadas a esses protocolos quimioterápicos.

Tabela 5 – Medianas de sobrevivência associadas a protocolos de quimioterapia após esplenectomia

Tratamento	Amostra	Estadio	Mediana de sobrevivência (dias)	Referências
Doxorrubicina	HE	I + II + III	172	Teske et al., 2011
	HE	II	133	Lana et al., 2007
	H	I	172 257	Ogilvie et al., 1996 Sorenmo et al., 2004
		II	210	Sorenmo et al., 2004
		III	107	Sorenmo et al., 2004
Doxorrubicina lipossomal peguilada	HE	II + III	131	Sorenmo et al., 2007
		I + II + III	166	Teske et al., 2011
		II	244	Sorenmo et al., 2007
		III	125	Sorenmo et al., 2007
Doxorrubicina + Ciclofosfamida	H	I + II + III	202	Sorenmo et al., 1993
		I	250	Sorenmo et al., 1993
		II	186	Sorenmo et al., 1993
		III	87	Sorenmo et al., 1993
		II + III	142	Finotello et al., 2015)
Doxorrubicina + Ciclofosfamida + Vincristina	HE	I + II + III	145	Hammer et la., 1991
	H	I + II + III	172	Hammer et la., 1991
Doxorrubicina + Dacarbazina + Vincristina	H	II + III	125	Dervisis et al., 2011
Doxorrubicina + Dacarbazina	H		>550	Finotello et al., 2015
Epirubicina	HE	I + II + III	144	Kim et al., 2007
		I	345	Kim et al., 2007
		II	93	Kim et al., 2007
		III	68	Kim et al., 2007
Ifosfamida	HE	I + II	147	Rassnick et al., 2000
Ifosfamida + Doxorrubicina	H	I + II + III	149	Payne et al., 2003
	HE	I + II + III	123	Payne et al., 2003

H: Hemangiossarcoma; HE: Hemangiossarcoma esplênico

3.5.2.2.1. Doxorrubicina

Os protocolos de quimioterapia que incluem a doxorrubicina permitem um aumento da mediana de sobrevivência dos animais para 4 a 8 meses, dependendo do local primário do tumor e do estadio da doença (Sorenmo et al, 2007).

Um dos protocolos baseia-se em 5 administrações intervaladas de 3 semanas entre si. Uma amostra de cães com hemangiossarcoma primário (estadio I), de diversas localizações primárias além da esplênica, foi sujeita a excisão cirúrgica tumoral total ou parcial em associação à administração de doxorrubicina. A mediana de sobrevivência do primeiro grupo foi superior, além de ter permitido que 20% dos animais atingisse um ano de vida após conclusão do protocolo quimioterápico (Ogilvie, Powers, Mallinckrodt & Withrow, 1996).

Num outro protocolo preconizam-se 5 administrações intervaladas de 2 semanas entre si. Esta intensificação da frequência de administração poderá aumentar a eficácia da quimioterapia e prolongar o período de sobrevivência e remissão, não só ao ultrapassar uma possível resistência aparente, mas também atrasando o desenvolvimento de uma resistência adquirida. Numa amostra de cães com hemangiossarcoma em estadio I e II submetida a este protocolo, obteve-se uma sobrevivência significativamente mais elevada relativamente aos animais de estadio III (Sorenmo et al., 2004). Apesar dos resultados ligeiramente mais favoráveis, não se verificou uma melhoria significativa do tempo de sobrevivência relativamente a outros protocolos contendo doxorrubicina (doxorrubicina isolada e doxorrubicina associada a ciclofosfamida e/ou vincristina). O aumento da frequência de administração poderá ser mais eficaz em animais com doença microscópica (metástases microscópicas) e não com uma situação metastática evidente, tendo em conta que um menor número de células neoplásicas está associado a uma menor probabilidade de se verificar uma resistência aos fármacos. Assim sendo, a doença microscópica tem uma maior probabilidade de ser erradicada pela quimioterapia (DeVita, 1983). No estudo atrás mencionado, apenas os cães com hemangiossarcoma nos estadio I e II permaneceram vivos pelo menos até 243 a 605 dias após a conclusão do protocolo (Sorenmo et al., 2004).

Outro ponto positivo deste último protocolo foi a tolerância exibida, pois nenhum cão neutropénico desenvolveu febre ou outro sinal consistente com sepsis, ou necessitou de hospitalização. Além disso, não foi registado nenhum caso de insuficiência cardíaca congestiva secundária a cardiomiopatia dilatada (Sorenmo et al., 2004).

Tendo em conta o seu maior tempo de semi-vida, a menor clearance plasmática pelo sistema monofagocitário e o menor volume de distribuição comparativamente à doxorrubicina, verifica-se que a doxorrubicina liposomal peguilada tem uma grande capacidade de se acumular no tecido tumoral (Gabizon & Catane, 1997). Também a cardiotoxicidade observada foi inferior à verificada após a administração de doxorrubicina simples (Sorenmo et al., 2007; Teske et al., 2001).

Seria expectável que a administração intraperitoneal de doxorrubicina atrasasse ou prevenisse uma recidiva associada a hemoabdomen por rutura de metástases intrabdominais. No entanto, essa hipótese foi rejeitada após a morte de 12 cães de uma amostra de 14, provocada pela presença de hemoabdomen resultante da rutura de metástases intrabdominais (Sorenmo et al., 2007). Já a metastização a nível do omento e serosas, foi inferior comparativamente aos animais tratados com doxorrubicina por via endovenosa, dada a maior capacidade de penetração tissular. Contudo outros verificaram uma menor metastização a nível do omento/mesentério, mas associada à administração endovenosa de doxorrubicina liposomal peguilada (Teske, Rutteman, Kirpenstein & Hirschberger, 2011).

De referir que não se registou uma diferença estatisticamente significativa nem na toxicidade, nem na mediana de sobrevivência apresentada pelos animais tratados por via endovenosa com doxorrubicina livre e peguilada.

O poder cardiotoxico da doxorrubicina manifesta-se clinicamente por uma insuficiência cardíaca congestiva secundária a cardiomiopatia dilatada. Esta caracteriza-se histologicamente por alterações irreversíveis degenerativas, lise, vacuolização e fibrose a nível do miocárdio (Mauldin et al., 1992). Assim, e no sentido de evitar a ocorrência de efeitos cardiotoxicos, foi definido um limite correspondente a uma dose cumulativa de 240 mg/m² (Kim, Liptak, Gall, Monteith & Woods, 2007). Em animais tratados com doxorrubicina numa dose cumulativa baixa (mediana de 99 mg/m²), uma percentagem de 18,9% apresentou alterações eletrocardiográficas (complexos ventriculares prematuros, arritmias supraventriculares e alterações na amplitude da onda R) de forma precoce (mediana de 77 dias após início do tratamento). Desta amostra, 4% dos animais morreram com uma dose cumulativa mediana de 150 mg/m², 90 dias após ser-lhes diagnosticada uma insuficiência cardíaca congestiva e 105 dias (mediana) após o início do tratamento (Mauldin et al., 1992).

Outros efeitos adversos observados foram letargia, anorexia, fraqueza, vômito, diarreia, gastroenterite e prurido, além de sepsis e febre associados a neutropenia secundária a mielossupressão (Teske, Rutteman, Kirpenstein & Hirschberger, 2011).

3.5.2.2.2. Doxorrubicina e ciclofosfamida

No primeiro dia do protocolo, a doxorrubicina é administrada por via endovenosa. Já a ciclofosfamida é administrada na sua totalidade por via endovenosa no mesmo dia que a doxorrubicina, ou é administrada por via oral, sendo a dose repartida por 3 ou 4 dias. No 22º dia do protocolo, o ciclo de tratamento repete-se, perfazendo um total de 4 a 6 ciclos (Thamm, 2013).

A aplicação do protocolo revelou uma tendência para uma mediana de sobrevivência superior quanto mais precoce for o estadio da doença (Sorenmo, Jeglum & Helfand, 1993).

A toxicidade manifesta-se por letargia, anorexia, diarreia, febre, neutropenia com ou sem necessidade de hospitalização, e insuficiência cardíaca (2 em 16 cães). A ocorrência de efeitos adversos graves numa percentagem de 6,8% aproxima-se do valor aceitável de toxicidade de 5% (Sorenmo et al., 1993). De referir a menor toxicidade deste protocolo comparativamente à combinação de doxorubicina, ciclofosfamida e vincristina, especialmente no que diz respeito à mielossupressão.

3.5.2.2.3. Doxorubicina, ciclofosfamida e vincristina

No primeiro dia do protocolo, a doxorubicina é administrada por via endovenosa. Já a ciclofosfamida é administrada na sua totalidade por via endovenosa no mesmo dia que a doxorubicina, ou é administrada por via oral, sendo a dose repartida por 3 ou 4 dias. A vincristina é administrada por via endovenosa ao 8º e 15º dia. No 22º dia do protocolo, o ciclo de tratamento repete-se, perfazendo um total de 4 a 6 ciclos (Thamm, 2013).

Os animais submetidos a este protocolo tiveram um tempo de sobrevivência mais prolongado do que os animais submetidos apenas a esplenectomia. O efeito hematológico tóxico mais comum foi a neutropenia (Hammer, Couto, Filppi, Getzy & Shank, 1991).

Recentemente, foi utilizado um protocolo alterado em alguns aspetos – ciclofosfamida administrada por via oral apenas no dia 10, e numa dose superior à do protocolo anteriormente referido. No sentido de reduzir a possibilidade de episódios febris secundários a neutropenia, também se acrescentou a administração de um antibiótico profilático (sulfametoxazol-trimetoprim) aos dias 1, 8, 10 e 15 (Hammer et al, 1991; Alvarez, Hosoya, Lara-Garcia, Kisseberth & Couto, 2013). A prevalência da neutropenia foi inferior (28% em vez de 73%) e não houve qualquer morte associada a sepsis, embora a percentagem relativa à toxicidade gastrointestinal tenha sido similar (25% em vez de 33%). Assim se conclui que este protocolo pode ser melhor tolerado que o anterior (Alvarez et al., 2013).

Não foi registada diferença significativa na mediana de sobrevivência entre os diferentes estadios em nenhum dos protocolos, pelo que não deve ser negada a sua prática em animais que se apresentem metastizados (Alvarez et al., 2013).

3.5.2.2.4. Doxorubicina, dacarbazina e vincristina

A administração endovenosa de doxorubicina e dacarbazina no dia 1 e vincristina nos dias 8 e 15, a cada 21 dias, demonstrou ser eficaz para prolongar o tempo de sobrevivência de cães com hemangiossarcoma nos estadios avançados II e III, além de uma taxa de resposta

total na ordem os 47,4% (Dervisis, Dominguez, Newman, Cadile & Kitchell, 2011). No entanto, a toxicidade foi significativa ao ponto de implicar a descontinuação do tratamento em 20% dos animais. Os efeitos observados foram do foro gastrointestinal (diarreia, vômito), e hematológico (anemia, neutropenia e trombocitopenia), Assim sendo, sugere-se a associação de anti-eméticos, como o maropitant, e antibióticos profiláticos (Dervisis et al., 2011).

3.5.2.2.5. Doxorubicina e dacarbazina

O protocolo que associa a doxorubicina e a dacarbazina demonstrou ser eficaz para prolongar o tempo de sobrevivência e o tempo até metastização evidente. Neste caso, a doxorubicina foi administrada a cada 3 semanas, e a dacarbazina e ciclofosfamida foram administradas durante 5 e 4 dias consecutivos, respetivamente, com a primeira dose a coincidir com o dia de administração da doxorubicina (Finotello, Stefanello, Zini & Marconato, 2015).

A utilização deste protocolo mostrou-se segura, com efeitos adversos reversíveis e de fácil gestão (sem necessidade de redução de dose ou aumento do intervalo entre tratamentos) num grupo de cães com hemangiossarcoma. Contudo a prevalência de neutropenia foi mais elevada nos cães sujeitos a este protocolo, comparativamente com os sujeitos à associação de doxorubicina e ciclofosfamida. Por outro lado, não se registou diferença significativa entre ambos relativamente à toxicidade gastrointestinal (Finotello, Stefanello, Zini & Marconato, 2015). No mesmo estudo, verificou-se que a mediana do tempo de sobrevivência e do tempo até evidência de metastização foi superior quando realizada a administração de doxorubicina e dacarbazina. Além disso, 66,8% dos animais atingiu o ano de sobrevivência, situação essa não reportada em nenhum dos cães submetidos à administração de doxorubicina e ciclofosfamida (Finotello et al., 2015).

A toxicidade gastrointestinal da combinação da doxorubicina com dacarbazina foi inferior à observada no protocolo que associa a doxorubicina, dacarbazina e ciclofosfamida. Tal poderá ser justificado não só pela administração diária e ao longo de vários dias consecutivos da dacarbazina, e não de uma só vez, mas também pela ausência da vincristina. Por outro lado, o primeiro protocolo incluía animais maioritariamente em estadio II, ao contrário do segundo, no qual o estadio III predominou (Finotello et al., 2015).

3.5.2.2.6. Epirubicina

A epirubicina é uma substância com atividade anti-tumoral equivalente, mas de menor mielotoxicidade e cardiotoxicidade que a doxorubicina. Para que fossem observados os mesmos efeitos adversos cardíacos, seria necessária uma dose cumulativa de epirubicina 1,7 a 2 vezes superior à da doxorubicina. Assim sendo, em animais com doença cardíaca

previamente detetada, a sua administração é recomendada como alternativa à doxorubicina (Kim, Liptak, Gall, Monteith & Woods, 2007). Note-se que apesar de não existir uma manifestação clínica de doença cardíaca, poderão existir alterações histológicas compatíveis (Sorenmo et al., 2004). No que diz respeito à sobrevivência, a eficácia é equivalente à doxorubicina (Kim et al., 2007).

A epirubicina foi administrada 5 a 6 vezes, com intervalos de 3 semanas, num grupo de cães com os vários estadios de hemangiossarcoma esplénico. Segundo Kim et al., (2007), a mediana de sobrevivência foi significativamente superior ao valor registado no grupo tratado apenas com esplenectomia. De referir o efeito desde protocolo nos cães em estadio III, cujo tempo de sobrevivência duplicou, apesar de continuar a ser inferior a 5 meses e sem qualquer animal a atingir o ano de sobrevivência. Já 4 dos 7 animais em estadio I, sobreviveram por um período de tempo superior a um ano após o tratamento. Também se verificou uma diferença significativa entre a mediana de sobrevivência da amostra correspondente ao estadio I, face aos estadios II e III, conclusão essa concordante com o melhor prognóstico do primeiro estadio (Kim et al., 2007).

As desvantagens deste protocolo são o custo mais elevado e a toxicidade gastrointestinal observada, pois 40% dos animais necessitaram de hospitalização devido a episódios de vómito e diarreia (Kim et al., 2007).

3.5.2.2.7. Ifosfamida

A ifosfamida foi administrada a cada 3 semanas em cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico em estadio I e II. Não se verificou diferença estatisticamente significativa relativamente a um grupo de animais apenas esplenectomizados (Rassnick et al., 2000). A mesma conclusão foi obtida após a administração de ifosfamida associada à doxorubicina (Payne et al., 2003).

Alguns efeitos tóxicos, referidos no Homem, são a mielossupressão, insuficiência renal, cistite hemorrágica, vómito e diarreia. O tratamento foi bem tolerado em cães, pois apenas se registaram alguns episódios de neutropenia e outros, como vómito, diarreia ou inapetência (Payne et al., 2003). Como já referido, está descrito que a administração concomitante de 2-mercaptoetano sulfonato elimina quase por completo a ocorrência de cistite hemorrágica. Nesse sentido, a ifosfamida foi administrada de forma diluída e em associação a esta substância uroprotetora, pelo que não se verificou nenhum caso de cistite hemorrágica (Rassnick et al., 2000).

3.5.3 Quimioterapia metronômica

A quimioterapia metronômica define-se como a administração contínua de fármacos quimioterápicos em doses significativamente inferiores à dose máxima tolerada utilizada na terapêutica convencional, pelo que a toxicidade inerente será também inferior (Burton, Mitchell, Thamm, Dow & Biller, 2011). Ao contrário do efeito citotóxico desta última, a primeira exerce um efeito inibidor na angiogénese tumoral a vários níveis, tal como através da inibição da mobilização de células progenitoras das células endoteliais de origem medular, ou da estimulação da produção de tromboespondina-1, potente inibidor angiogénico (Elmslie, Glawe & Dow, 2008). Também está reportada a diminuição do número de células T reguladoras em animais submetidos a quimioterapia metronômica. Assim sendo, verifica-se a supressão dos efeitos inibidores que as células T reguladoras exercem nas células T citotóxicas e *helper*, e nas células *natural killer*, potenciando a resposta imunitária anti-tumoral (Gaspar, Henriques, Marconato & Queiroga, 2018). Esta terapêutica é uma tentativa de prevenir o desenvolvimento e a metastização tumoral (Sorensen et al., 2000).

No sentido de comparar o protocolo convencional contendo a doxorrubicina e a quimioterapia metronômica, um grupo de cães com hemangiossarcoma em estadio II foi sujeito a esplenectomia e a um protocolo de 6 meses que combina a administração diária de piroxicam com etoposido e ciclofosfamida (estes dois últimos compostos foram administrados diariamente de forma alternada em ciclos de 3 semanas cada um). A mediana de sobrevivência foi significativamente superior (178 dias) à obtida após o tratamento de uma amostra com as mesmas características, com 5 administrações de doxorrubicina a cada 2 semanas após esplenectomia (Lana et al., 2007). Além disso, não houve nenhum animal que apresentasse grau 3 ou 4 de toxicidade hematológica ou gastrointestinal no primeiro grupo, ao contrário da toxicidade gastrointestinal de grau 3 ou 4 observada em alguns animais do segundo grupo (Lana et al., 2007). Assim se conclui que a quimioterapia metronômica é uma boa alternativa ao protocolo convencional que inclui a doxorrubicina, não só pela eficácia em termos de sobrevivência, mas também pela boa tolerância exibida.

A utilização de inibidores das cicloxigenases (piroxicam, por exemplo) foi proposta como parte do tratamento anti-neoplásico, pois a utilização em vários processos tumorais tem-se demonstrado vantajosa (Hayes, 2007). A cicloxigenase 1 (COX-1) exerce um efeito citoprotetor no estômago, vasodilatador no rim e promove a produção plaquetária de tromboxano, estimulando a sua agregação. A cicloxigenase 2 (COX-2) tem um papel na inflamação, ovulação, crescimento, diferenciação e carcinogénese, pelo que uma sobre-expressão desta enzima pode ter um papel na carcinogénese, ao diminuir a apoptose celular, ao aumentar a atividade das metaloproteinases, ao aumentar o metabolismo dos xenobióticos (transformação química de compostos conhecidos como carcinogénicos), a

inflamação crônica e a imunossupressão; e ao promover a angiogênese e produção do fator de crescimento endotelial vascular e do fator de crescimento básico fibroblástico (Hayes, 2007). Idealmente, deve ser privilegiada a administração de fármacos com ação inibitória preferencial da COX-2, no sentido de evitar ao máximo a inibição da COX-1, cujas consequências podem ser uma menor agregação plaquetária, menor integridade da mucosa gástrica e toxicidade renal, condições essas potencialmente agravadas pelo tumor em si e pelo tratamento citotóxico convencional (Hayes, 2007).

Burton et al. (2011) verificaram que a administração de ciclofosfamida diariamente durante 28 dias culminou na inibição das células T reguladoras (células essas que previnem uma resposta imunitária anti-tumoral) cujo número circulante em cães com neoplasia está elevado. Assim sendo, a quimioterapia metronômica pode potencializar a resposta imunitária anti-tumoral, além de diminuir a densidade vascular tumoral. Uma vez que tanto a ciclofosfamida, como os inibidores da COX-2, inibem a angiogênese e exercem um efeito supressor das células T reguladoras, pensa-se que a associação das duas substâncias potencie o efeito de cada uma (Elmslie et al., 2008).

Os animais tratados com quimioterapia convencional (protocolo que inclui a administração de doxorrubicina endovenosa em associação ou não com outro fármaco) e metronômica (protocolo baseado na administração oral de ciclofosfamida juntamente com um anti-inflamatório não esteróide) obtiveram uma mediana de sobrevivência superior (129 dias) à dos animais que foram sujeitos apenas à quimioterapia convencional (90 dias), ou à metronômica (102 dias) de forma isolada. Tal observação sugere um efeito sinérgico, aditivo, caracterizado pela combinação de um efeito citotóxico e anti-angiogénico (Wendelburg et al., 2015). A aplicação destas duas variantes pode ser simultânea ou sequencial. No sentido de tirar partido do efeito sinérgico, a aplicação simultânea de um protocolo convencional que inclua a doxorrubicina com um protocolo metronómico que inclua ciclofosfamida e um anti-inflamatório não esteróide (inibidor da ciclooxigenase) deve ser a primeira opção, apesar do maior risco de ocorrência de efeitos adversos gastrointestinais e hematológicos (Wendelburg et al., 2015).

3.5.4. Outros tratamentos anti-angiogénicos

Esses tratamentos baseiam-se na administração de compostos inibidores das metaloproteinases (como a minociclina), compostos esses com efeito direcionado a fatores pro-angiogénicos (fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento básico fibroblástico), e outros que inibam as células endoteliais, como a angiostatina (North & Banks, 2009). Na tabela 6 apresentam-se as medianas de sobrevivência associadas à administração de minociclina e toceranib.

3.5.4.1. Minociclina

O hemangiossarcoma tem a capacidade de alterar diretamente a regulação normal do processo de angiogênese através da produção de fatores angiogênicos, colagenases e proteinases, ou indiretamente através de células inflamatórias. Efetivamente, as células endoteliais e neoplásicas produzem metaloproteinases, tais como colagenases, gelatinases e estromolisinas, cuja função é degradar a matriz extracelular, de modo a facilitar a sua invasão por neovasos (Sorenmo et al., 2000).

A adição da minociclina (substância com atividade anti-colagenase) a um protocolo quimioterápico concêntrico (doxorrubicina associada a ciclofosfamida) não revelou qualquer benefício estatisticamente significativo relativamente à sobrevivência registada por Sorenmo et al. (1993) em animais sujeitos apenas a quimioterapia convencional, baseada na combinação de doxorrubicina e ciclofosfamida (tabela 6). Algumas explicações possíveis são a ativação de outros mecanismos pro-angiogênicos em resposta à ação desta substância, a administração de uma dose insuficiente de minociclina para inibir a colagenase, e o não envolvimento desta enzima na progressão do hemangiossarcoma (Sorenmo et al., 2000).

3.5.4.2. Toceranib

Quando ativada por mutação de um oncogene, a tirosina quinase estimula um crescimento celular anormal, ou seja, uma neoplasia (North & Banks, 2009). O toceranib é uma substância que bloqueia os recetores da tirosina quinase (recetores do fator de crescimento derivado das plaquetas e do fator de crescimento endotelial vascular) expressos pelas células tumorais. Nesse sentido, colocou-se a hipótese de que a inibição destes recetores teria um efeito direto no crescimento tumoral, e indireto também, pelo seu efeito anti-angiogénico (Gardner et al., 2015).

No sentido de obter um melhor prognóstico que a quimioterapia ou a imunoterapia, procedeu-se à administração de toceranib em dias alternados, numa amostra de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico nos estadios I e II. Apenas foram sujeitos à administração desta substância os animais sem evidência de metástases após 5 ciclos de doxorrubicina intervalados de 2 semanas, ou seja, 31 dos 43 animais inicialmente incluídos no estudo (Gardner et al., 2015).

Contudo a administração do toceranib não demonstrou melhoria significativa na sobrevivência face à administração isolada de doxorrubicina. Além disso, a formação de metástases foi posteriormente evidenciada em 25 dos 31 cães sujeitos à administração do toceranib (Gardner et al., 2015).

Tabela 6 – Medianas de sobrevivência associadas à administração de minociclina e toceranib

Tratamento	Amostra	Estadio	Mediana de sobrevivência (dias)	Referências
Minociclina + Doxorrubicina + Ciclofosfamida	H	I + II + III	170	Sorenmo et al., 2000
		I	273	Sorenmo et al., 2000
		II	156	Sorenmo et al., 2000
		III	136	Sorenmo et al., 2000
Doxorrubicina + Ciclofosfamida	H	I + II + III	202	Sorenmo et al., 1993
		I	250	Sorenmo et al., 1993
		II	186	Sorenmo et al., 1993
		III	87	Sorenmo et al., 1993
Toceranib + Doxorrubicina	HE	I + II	172	Gardner et al., 2015
Toceranib + Doxorrubicina e Doxorrubicina apenas	HE	I + II	169	Gardner et al., 2015

H: Hemangiossarcoma; HE: Hemangiossarcoma esplênico

3.5.5 Imunoterapia

A imunoterapia tem sido referida como uma opção terapêutica promissora na oncologia humana e veterinária.

3.5.5.1 Muramil tripéptido fosfatidiletanolamina liposomal encapsulado (L-MTP-PE)

O L-MTP-PE é um imunomodulador capaz de ativar os monócitos e macrófagos, para que estes reconheçam e destruam as células neoplásicas. Ao contrário do protocolo de doxorrubicina administrada com uma maior frequência, ou do que inclui a minociclina, cujos tempos de sobrevivência observados não demonstraram benefícios face à administração tradicional da doxorrubicina, a combinação de L-MTP-PE (duas vezes por semana, durante 8 semanas) associado a quimioterapia (4 ciclos de doxorrubicina e ciclofosfamida intervalados de 3 semanas) apresentou uma melhoria significativa da mediana de

sobrevivência. Efetivamente, este foi o maior valor respeitante à sobrevivência reportado em cães com hemangiossarcoma esplênico (Vail et al., 1995).

O protocolo culminou numa menor metastização, maior tempo livre de doença e maior mediana de sobrevivência em cães de estadio I, comparativamente com a verificada nos animais em estadio II. Também se registou uma diferença significativa destes parâmetros entre os animais em estadio I que receberam o L-MTP-PE, e os que receberam apenas o lipossoma placebo (sem MTP-PE, ou seja, sem efeito), ao contrário dos animais em estadio II (Vail et al., 1995). Os valores das medianas de sobrevivência deste estudo estão ilustrados na tabela 7. Assim se conclui que associação da imunoterapia à quimioterapia pode culminar numa maior sobrevivência que a quimioterapia isoladamente.

3.5.5.2. Vacina

Vários cães com hemangiossarcoma foram sujeitos à administração de uma vacina juntamente com a doxorrubicina, por via intraperitoneal, num total de 8 administrações. Esta vacina foi preparada a partir de lisados de linhas celulares de hemangiossarcoma canino (U'Ren, Biller, Emslie, Thamm & Dow, 2007).

A sua aplicação gerou uma resposta humoral contra as células neoplásicas e foi bem tolerada. A mediana de sobrevivência foi superior à observada previamente num grupo de animais também em estadio II, aos quais apenas foi administrada a doxorrubicina (tabela 7), pelo que se concluiu que a imunoterapia associada à quimioterapia pode resultar numa maior sobrevivência do que a quimioterapia isoladamente (U'Ren et al., 2007).

Tabela 7 - Medianas de sobrevivência obtidas pela imunoterapia e quimioterapia convencional

Tratamento	Amostra	Estadio	Mediana de sobrevivência (dias)	Referências
L-MTP-PE + Doxorrubicina + Ciclofosfamida	HE	I + II	277	Vail et al, 1995
		I	425	Vail et al, 1995
		II	162	Vail et al, 1995
Lipossoma placebo + Doxorrubicina + Ciclofosfamida	HE	I + II	143	Vail et al, 1995
Lipossoma placebo + Doxorrubicina + Ciclofosfamida		I	166	Vail et al, 1995
Lipossoma placebo + Doxorrubicina + Ciclofosfamida		II	96	Vail et al, 1995
Vacina	H	II	182	U'Ren et al., 2007
Doxorrubicina	H	II	133	U'Ren et al., 2007

L-MTP-PE: Muramil tripéptido fosfatidiletanolamina liposomal encapsulado;
H: Hemangiossarcoma; HE: Hemangiossarcoma esplênico

IV. ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS E PROGNÓSTICO DE HEMANGIOSSARCOMA ESPLÊNICO EM CÃO

1. Objetivos

Perante uma lesão suspeita de hemangiossarcoma esplênico, é habitual e natural que os detentores dos animais coloquem algumas questões acerca do prognóstico da situação, da sobrevivência expectável para o quadro presente (consoante a ocorrência de rutura esplênica ou não), e das várias opções terapêuticas. Assim sendo, procurou-se obter informação que contribua para dar resposta a essas questões.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar se os parâmetros eritrocitários apresentam algum valor de prognóstico no hemangiossarcoma esplênico em cães.

Nesse sentido, o presente trabalho propôs-se a:

- Analisar a sobrevivência entre grupos de animais, em função de um valor limite/*cut-off* para o hematócrito, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina;
- Analisar a sobrevivência entre os animais que se apresentaram com e sem rutura esplênica;
- Analisar a sobrevivência entre os animais submetidos apenas a tratamento cirúrgico (esplenectomia total), e os que foram submetidos a esplenectomia total e posterior quimioterapia.

A hipótese inicial formulada é a de que o tempo de sobrevivência será inferior nos animais com valores mais baixos de hematócrito, da contagem de eritrócitos e da concentração de hemoglobina; com presença de rutura esplênica; e naqueles submetidos apenas a esplenectomia.

2. Materiais e Métodos

2.1 Critérios de inclusão e exclusão

O processo de seleção dos elementos da amostra baseou-se no cumprimento de três pré-requisitos, definidos como critérios de inclusão. Nesse sentido, todos os animais tiveram que evidenciar um diagnóstico definitivo histopatológico de hemangiossarcoma esplênico; ter sido submetidos a esplenectomia; e ser conhecido o valor de hematócrito correspondente ao momento de apresentação inicial.

Foram excluídos os cães não sujeitos a tratamento cirúrgico (esplenectomia) (n=2), seja por terem morrido secundariamente a um quadro de choque após rutura esplênica, seja por terem sido eutanasiados por opção do proprietário.

2.2.Recolha de dados

Este estudo retrospectivo incidiu numa amostra de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico no período compreendido entre Janeiro de 2011 e Fevereiro de 2018, no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária.

O diagnóstico histopatológico de hemangiossarcoma esplênico referente aos anos 2011 e 2012 foi obtido diretamente do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, enquanto que o dos anos subsequentes foi recolhido do sistema de base de dados do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (Qvet). O mesmo constituiu a principal fonte não só de dados epidemiológicos como a idade, raça e género,

mas também do resultado de exames complementares, tratamento instituído, e evolução clínica. Em alguns casos, o detentor foi contactado por via telefónica, visando obter informação acerca da evolução clínica, e data e causa de morte, quando aplicável.

2.3. Análise de dados

Os elementos constituintes da amostra foram agrupados consoante o estadio clínico, o tratamento efetuado (esplenectomia ou esplenectomia associada a posterior quimioterapia), a presença ou não de rutura esplénica, e de acordo com valores *cut-off* estipulados para o hematócrito, para a concentração de hemoglobina e para a contagem de eritrócitos.

Os animais foram estadiados em: estadio I (lesão neoplásica não raturada confinada ao baço); estadio II (lesão neoplásica raturada associada a hemoperitoneu e sem evidência de metastização à distância); e estadio III (lesão neoplásica raturada associada a hemoperitoneu e com evidência de metastização à distância), com base no exame físico, nas imagens radiológicas e/ou ecográficas obtidas, e nas alterações observadas durante a cirurgia (esplenectomia).

A mediana de cada parâmetro eritrocitário (26.2% para o hematócrito, $3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$ para a contagem de eritrócitos, e 8.97 g/dl para a concentração de hemoglobina) representou o valor limite/*cut-off*, valor esse utilizado para a alocação dos cães em dois grupos constituídos por animais caracterizados por um valor de hematócrito superior ou igual, e inferior a 26.2%; por uma contagem de eritrócitos superior ou igual, e inferior a $3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$; e por uma concentração de hemoglobina superior ou igual, e inferior a 8.97 g/dl.

O método de *Kaplan-Meier*, de análise de sobrevivência, foi aplicado para os vários grupos referidos, e a mediana de sobrevivência foi utilizada para a caracterização e comparação dos mesmos. Esta medida representa o tempo ao fim do qual 50% dos elementos da amostra atingiu o evento de interesse (morte). Para avaliar se a diferença na sobrevivência entre os grupos a dado ponto foi estatisticamente significativa, ou seja, se é provável que se deva a efeitos aleatórios, utilizou-se o valor de p, calculado pelo teste de significância *Logrank*. Essa diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

A correlação entre os três parâmetros eritrocitários e o tempo de sobrevivência foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman (*r*), cujo valor varia entre -1 (correlação negativa entre variáveis) e 1 (correlação positiva entre variáveis). Além disso, recorreu-se ao teste t para comparar a anemia verificada no grupo de animais com e sem rutura esplénica, diferença essa considerada significativa quando $p < 0.05$.

A base de dados foi criada no *Microsoft Office Excel 2007®*, e a análise estatística foi realizada no programa *GraphPad Prism 7.04®*.

3. Apresentação e Discussão de resultados

O hemangiossarcoma esplênico é uma neoplasia maligna de origem endotelial caracterizada por lesões constituídas por zonas necróticas e cavidades preenchidas por sangue, e pela sua friabilidade, pelo que facilmente ruturam (Thamm, 2013). Assim sendo, a maioria dos animais afetados apresenta um quadro inicial de hemoperitoneu, associado a notória distensão abdominal (Clifford & Lorimier, 2017). A coexistência de hemoperitoneu e de massa esplênica é um achado frequente e de forte suspeita de hemangiossarcoma esplênico, reportada na ordem dos 63 a 70% (Pintar, Breitschwerdt, Hardie & Spaulding, 2003; Aronsohn, Dubiel, Roberts & Powers, 2009). No presente estudo, o valor correspondente a essa coexistência foi superior, na ordem dos 83%. Nos cães sem rutura, a lesão foi um achado ecográfico. As razões pelas quais foi realizada uma ecografia abdominal foram várias, desde uma história de prostração e perda de peso, a dor, a suspeita de hepato ou esplenomegália, e à presença de um abdómen tenso aquando da palpação abdominal.

O diagnóstico histopatológico de hemangiossarcoma esplênico foi registado em 35 cães. Destes, 29 apresentaram rutura esplênica, dos quais 15 evidenciaram lesões compatíveis com metástases em outros órgãos abdominais (estadio III), e 14 não apresentaram qualquer sinal de metastização à distância (estadio II). Os restantes 6 elementos apresentaram uma lesão confinada ao baço (estadio I). O agrupamento dos animais em função da presença ou não de rutura esplênica e do estadio clínico está ilustrado na tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição dos animais em função da presença ou não de rutura esplênica e do estadio clínico

HE (35)	Não ruturado (6)	Estadio I (6)
	Ruturado (29)	Estadio II (15)
		Estadio III (14)

HE – Hemangiossarcoma esplênico

Apesar da reconhecida metastização precoce, em apenas 43% dos cães, foram evidenciadas inicialmente lesões compatíveis com metástases, percentagem essa inferior ao valor de 80% reportado por Thamm (2013). O fígado foi o órgão no qual as lesões suspeitas foram identificadas de forma mais prevalente (87%), seguido do omento (13%). Estes órgãos fazem parte do grupo de órgãos onde mais frequentemente se verifica a presença de metástases (Smith, 2003). No presente estudo, o fígado foi efetivamente o

órgão onde se verificou uma maior prevalência de possíveis metástases (n=13), seguido pelo omento (n=2).

Os elementos constituintes da amostra foram agrupados tendo em conta o tratamento efetuado (tabela 9). A esplenectomia foi realizada na totalidade da amostra, dos quais apenas 7 foram posteriormente alvo de quimioterapia, aproximadamente 25 dias (mediana) após a cirurgia. A quimioterapia realizada variou entre a convencional (incluindo a doxorrubicina) e/ou metronómica (ciclofosfamida e/ou piroxicam).

Tabela 9 - Distribuição dos animais em função do tratamento efetuado

Esplenectomia (35)	Com quimioterapia (7)
	Sem quimioterapia (28)

A maioria dos cães com hemangiossarcoma apresenta uma idade média variável entre 8 e 13 anos (Smith, 2003), dado esse concordante com o valor da idade média de 11.03 ± 2.24 anos, obtido no presente estudo (gráfico 1). Também se registou um maior número de elementos do género masculino (19/35) do que do sexo feminino (16/35), reforçando uma possível predisposição masculina, referida por Thamm (2013).

Historicamente, tem sido reportada uma maior prevalência de hemangiossarcoma no género masculino e nas raças Pastor Alemão, Labrador e *Golden Retriever* (Schultheiss, 2004; Gamlem, Nordstoga & Arnesen, 2008). A distribuição rácica dos elementos constituintes da amostra encontra-se ilustrada pelo gráfico 2, concluindo-se a maior prevalência das raças Labrador, (11/34), indeterminada (9/34) e Pastor Alemão (6/34). Apenas 3 animais corresponderam à raça *Golden Retriever*. De referir que hoje em dia, os cães de raça indeterminada representam uma grande percentagem da população canina, pelo que a sua expressão neste estudo não deve ser sobrevalorizada.

Gráfico 1 – Distribuição em caixa-de-bigodes da idade dos animais em estudo

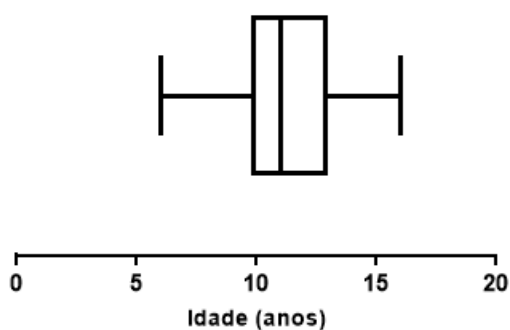
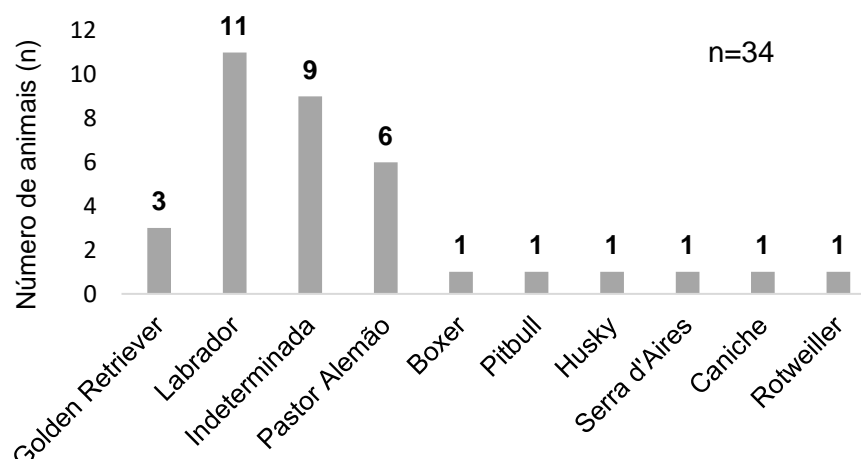


Gráfico 2 – Distribuição rácica dos animais em estudo



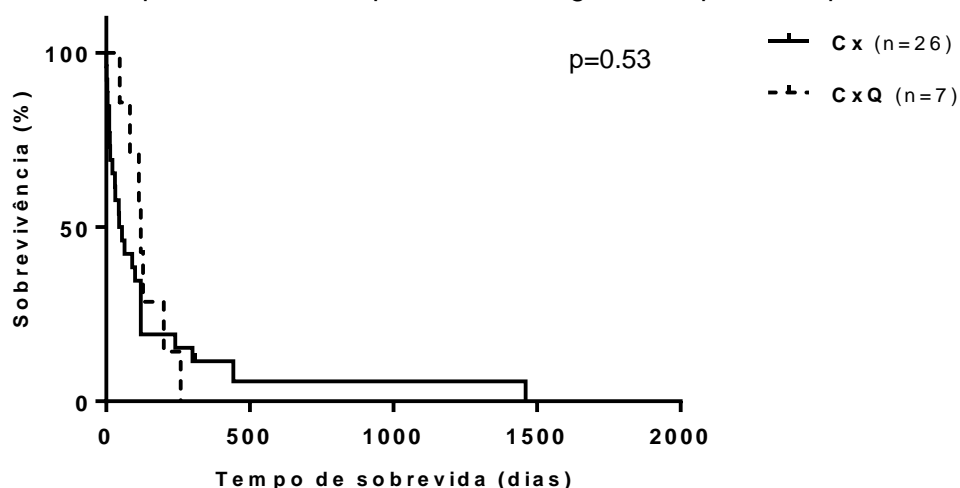
A evolução clínica foi obtida a partir do sistema de base de dados (n=22), e após contato telefónico dos respetivos detentores (n=13), não tendo sido obtida resposta de dois deles.

De todos os animais, apenas 1 se apresentava vivo em fevereiro de 2018. Os restantes foram submetidos a eutanásia (n=22) ou morreram espontaneamente (n=10). A maioria das mortes esteve relacionada com uma provável recidiva neoplásica (n=22), tendo em conta o registo da presença de hemoperitонеu (n=19), associado ou não à evidência de nódulos/massas em órgãos como o fígado (n=13) e pulmões (n=2).

3.1. Análise de sobrevivência consoante o tratamento

As curvas de sobrevivência obtidas para os cães submetidos apenas a esplenectomia e para os que adicionalmente foram sujeitos a quimioterapia, tendo em conta não só a totalidade da amostra, mas também a presença ou não de rutura esplénica, encontram-se ilustradas pelos gráficos 3 e 4, respetivamente.

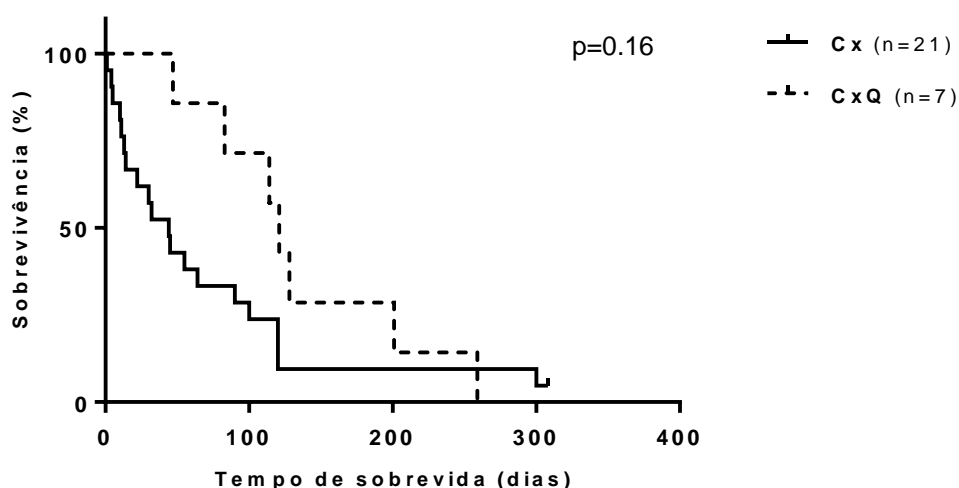
Gráfico 3 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais submetidos a esplenectomia, e esplenectomia seguida de quimioterapia



Cx – Cirurgia (esplenectomia); CxQ – Cirurgia (esplenectomia) e quimioterapia

As tabelas 4 e 5 da presente dissertação reúnem os valores correspondentes às medianas de sobrevivência registradas nos animais submetidos ou não a quimioterapia, após esplenectomia, registrando-se valores superiores nos primeiros. Também neste estudo a mediana de sobrevivência em animais sujeitos a esplenectomia e quimioterapia (121 dias) foi superior aos que apenas foram submetidos a esplenectomia (50 dias). No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0.53$), talvez pela marcada discrepância entre o número de elementos pertencentes aos dois grupos.

Gráfico 4 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* de animais com rutura esplênica sujeitos a esplenectomia e a esplenectomia e posterior quimioterapia



Cx – Cirurgia (esplenectomia); CxQ – Cirurgia

Contabilizando apenas os animais com rutura, a mediana de sobrevivência dos animais esplenectomizados (44 dias) foi também inferior à registrada para os animais alvo de

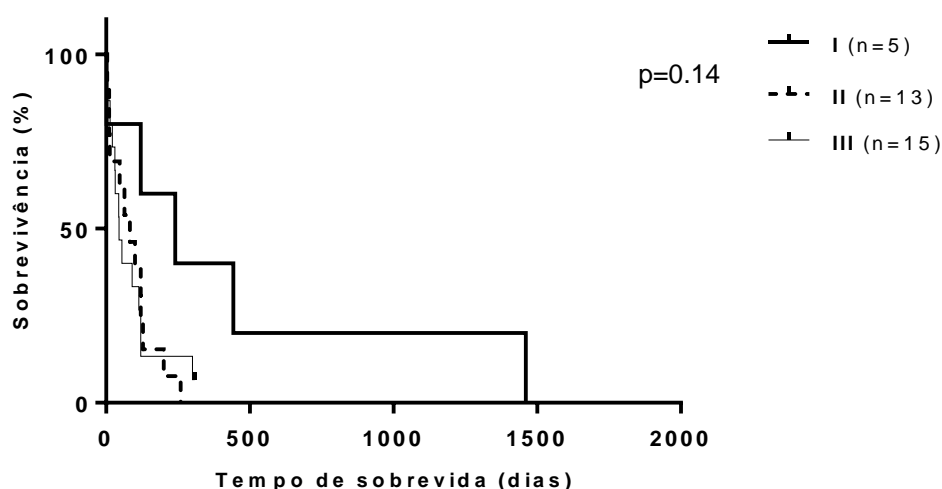
posterior quimioterapia (121 dias), apesar de também não se ter obtido significância estatística para a diferença observada ($p=0.16$).

Um animal aparentemente livre de metástases submetido a esplenectomia devido a suspeita de hemangiossarcoma esplênico, pode apresentar micrometástases. Quanto menor é a massa tumoral, maior é a fração de crescimento, e menor é o tempo de duplicação, pelo que maior é a sensibilidade à quimioterapia. Além disso, quanto maior for a lesão, maior é a probabilidade de ocorrerem mutações e de existirem sub-populações que adquiriram resistência à quimioterapia (Couto, 2014b). Assim sendo, neste contexto não deve ser negada ou excluída a realização de quimioterapia, visando impedir ou atrasar o desenvolvimento da neoplasia, e consequentemente prolongar o tempo de sobrevivência, seja pelo seu efeito citotóxico e/ou anti-angiogénico. Também o tempo que medeia a esplenectomia e o início da quimioterapia pode fazer a diferença na análise de sobrevivência, devendo este ser o mais curto possível, tendo em conta o carácter agressivo e a metastização precoce típicos de um hemangiossarcoma. No estudo apresentado, o intervalo variou entre 10 e 68 dias (mediana equivalente a 25 dias).

3.2. Análise de sobrevivência consoante o estadio clínico (I, II ou III) e a presença ou não de rutura esplénica

A associação entre o estadio clínico e a sobrevivência é alvo de alguma controvérsia. Apesar de não se ter verificado uma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes estadios ($p=0.14$), a mediana de sobrevivência foi superior no grupo de cães em estadio I (240 dias), seguindo-se uma mediana de 83 dias registada para o estadio II e um valor inferior (45 dias) para o estadio III (gráfico 5). Também Wendelburg et al. (2015) reportaram um valor da mediana de sobrevivência tanto maior, quanto menor for o estadio clínico dos animais com hemangiossarcoma esplênico (165 dias para o estadio I, 60 dias para o estadio II, e 27 dias para o estadio III). Assim, os mesmos autores concluíram o importante valor de prognóstico do estadiamento, e utilidade do mesmo na decisão dos detentores dos animais em avançar para esplenectomia ou não.

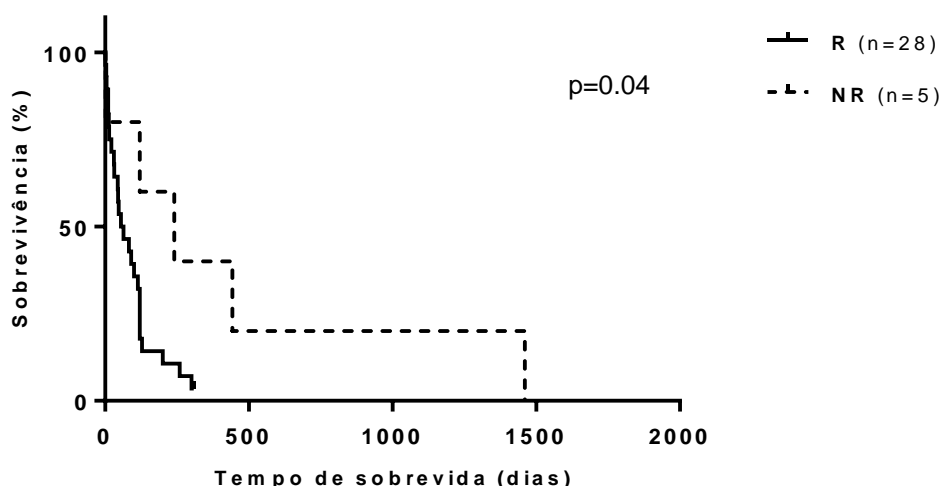
Gráfico 5 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais pertencentes aos diferentes estadios (I, II ou III) de hemangiossarcoma esplênico



A mediana de sobrevivência calculada no grupo de animais sem rutura esplênica/estadio I (240 dias) foi significativamente superior à registada em animais com rutura esplênica/estadios II e III (59.5 dias) ($p=0.04$) (gráfico 6), pelo que se pode atribuir um prognóstico mais favorável quando não se verifica a ocorrência de hemoperitонеu. Do mesmo modo, Prymak et al. (1985) registaram uma maior mediana de sobrevivência em animais sem hemoperitонеu/estadio I (121 dias), comparativamente ao valor reportado em animais com hemoperitонеu/estadios II e III (17 dias).

Assim sendo, a presença inicial de metástases foi relacionada com um menor tempo de sobrevivência, sem nenhum cão em estadio III a atingir o ano de sobrevivência pós-cirúrgica, tal como verificado por Wendelburg et al. (2015). No nosso estudo, apenas dois cães ultrapassaram o ano de sobrevivência pós-cirúrgica, ambos pertencentes ao estadio I/sem rutura esplênica. Também Wendelburg et al. (2015) registaram uma maior taxa de sobrevivência, de um ano, nos animais em estadio I/sem rutura. Efetivamente, a rutura esplênica/estadios II e III culmina na disseminação tumoral transcelômica, facilitando a progressão da doença e promovendo uma morte mais precoce.

Gráfico 6 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* de animais com e sem rutura esplénica



3.3. Análise dos parâmetros eritrocitários consoante a presença ou não de rutura esplénica

A anemia associada a hemangiossarcoma esplénico pode ter uma origem hemorrágica e/ou hemolítica. A primeira verifica-se secundariamente a rutura tumoral, culminando num quadro de hemoperitонеu; a segunda, também designada anemia hemolítica microangiopática, caracteriza-se pela lise eritrocitária devida à arquitetura vascular tumoral anormal, marcada pela presença de vasos irregulares e tortuosos, e presença de depósitos de fibrina intravasculares (Smith, 2003).

A anemia foi um achado comum à grande maioria dos animais (94.3%). Todos os animais com rutura esplénica apresentaram-se inicialmente anémicos, anemia essa marcada por uma média do valor de hematócrito (26.1%) inferior e de forma estatisticamente significativa à registada nos cães sem rutura (34.4%) ($p=0.04$), tal como ilustrado pelo gráfico 7. Tal pode estar associado ao carácter agudo que define uma situação de rutura esplénica, situação essa na qual uma grande percentagem do volume sanguíneo é perdida num curto espaço de tempo para a cavidade abdominal. Pelo contrário, tal não se verifica num quadro sem rutura, onde apenas pode persistir uma anemia hemolítica, possibilitando que a resposta regenerativa acompanhe gradualmente a perda de eritrócitos. De fato, a maioria dos elementos da amostra nos quais não se registou anemia faziam parte do grupo de cães sem rutura esplénica. Além disso, apesar da não significância estatística obtida, os animais com rutura inicial apresentaram também um valor inferior da contagem de eritrócitos ($3.89 \times 10^6/\mu\text{l}$) e da concentração de hemoglobina (8.96 g/dl), comparativamente àqueles nos quais não se identificou a ocorrência de rutura ($4.79 \times 10^6/\mu\text{l}$ e 10.9 g/dl, respetivamente) ($p=0.05$ e 0.06, respetivamente), como representado nos gráficos 8 e 9.

Gráfico 7 – Distribuição em caixa-de-bigodes do hematócrito em cães com e sem rutura

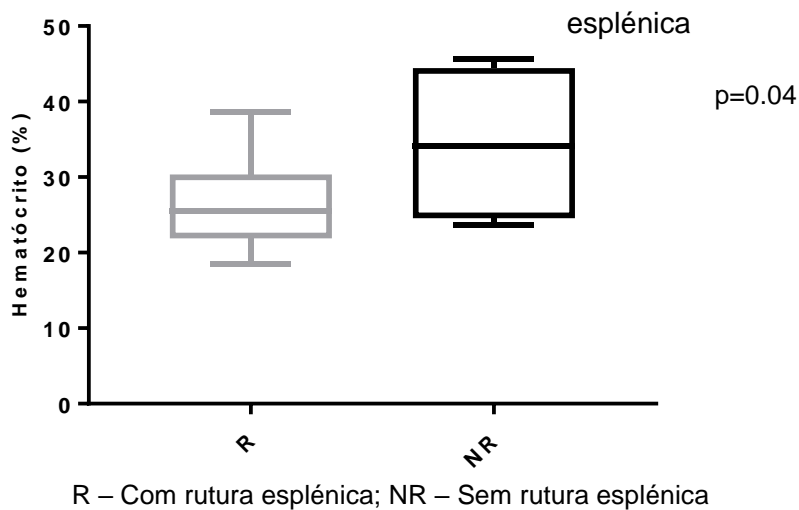


Gráfico 8 – Distribuição em caixa-de-bigodes da contagem de eritrócitos em cães com e sem rutura esplénica

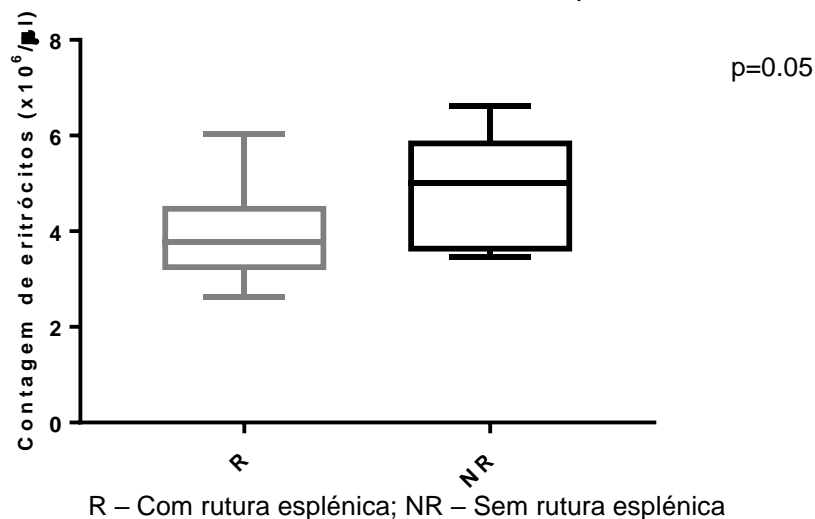
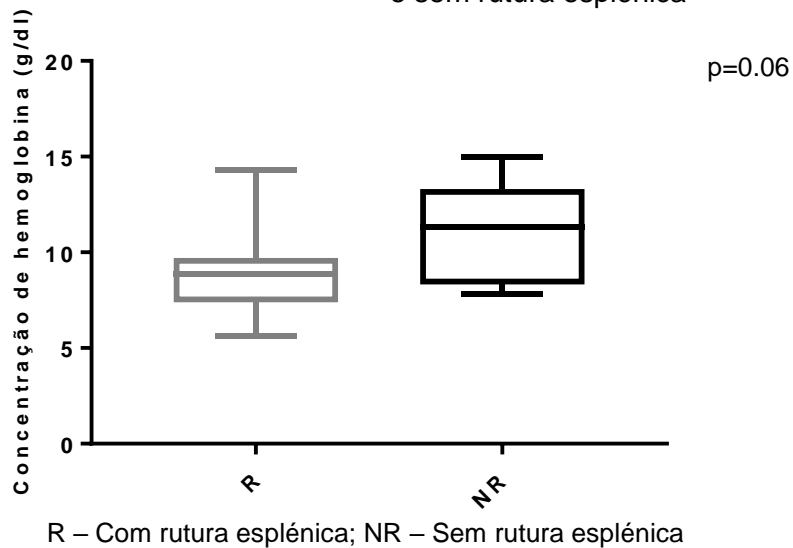


Gráfico 9 - Distribuição em caixa-de-bigodes da concentração de hemoglobina em cães com e sem rutura esplénica



3.4. Análise de correlação entre os parâmetros eritrocitários e o tempo de sobrevivência

Verificou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o tempo de sobrevivência e os parâmetros eritrocitários indicadores de anemia, incluindo o hematócrito ($p=0.002$), a contagem de eritrócitos ($p=0.02$), e a concentração de hemoglobina ($p=0.001$) (gráficos 10, 11 e 12, respectivamente). Assim, quanto mais elevados são os parâmetros eritrocitários, maior será o tempo de sobrevivência de um animal com hemangiossarcoma esplênico. Um cão destacou-se pelo tempo de sobrevivência notoriamente superior aos dos restantes animais, dado apresentar os valores mais elevados correspondentes aos parâmetros eritrocitários. Assim sendo, caso estes valores tivessem sido mais elevados nos restantes elementos da amostra, o coeficiente de correlação de *Spearman* obtido para os diferentes parâmetros eritrocitários poderia ter sido superior.

Gráfico 10 – Análise de correlação de *Spearman* entre o hematócrito e o tempo de sobrevivência

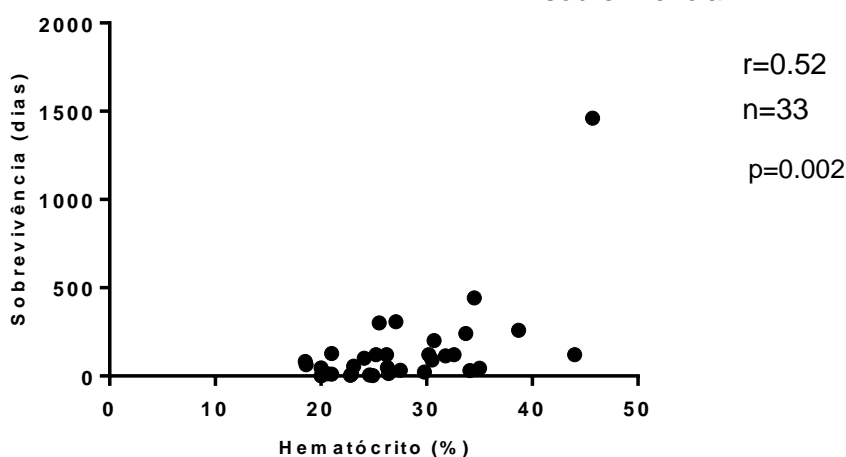


Gráfico 11 – Análise de correlação de *Spearman* entre a contagem de eritrócitos e o tempo de sobrevivência

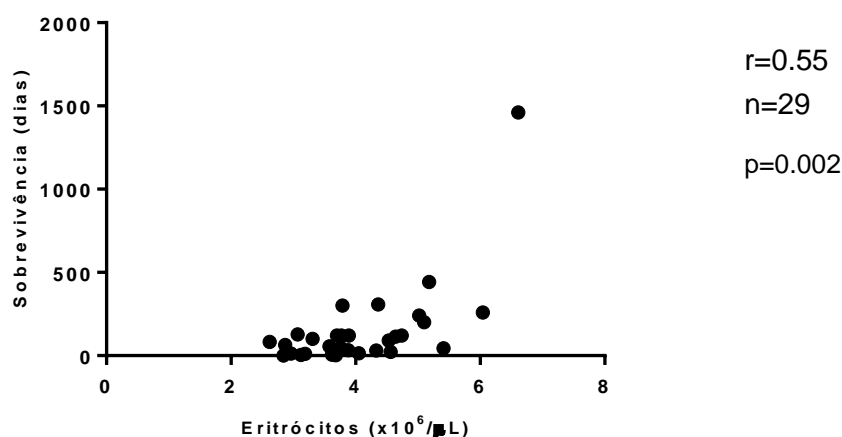
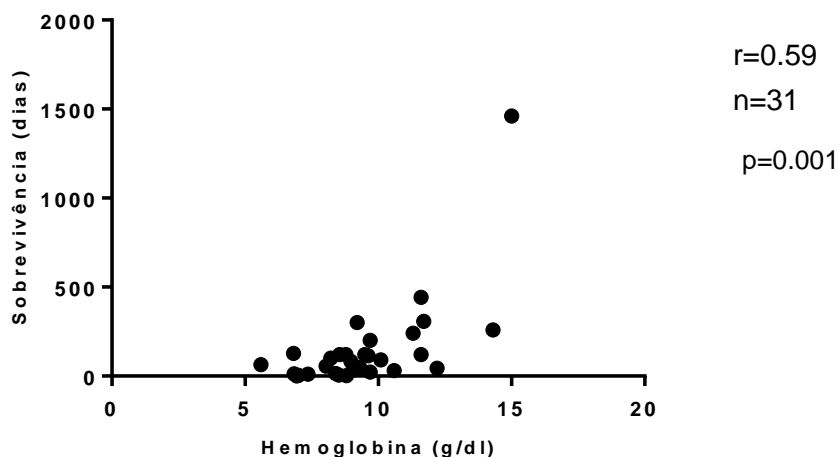


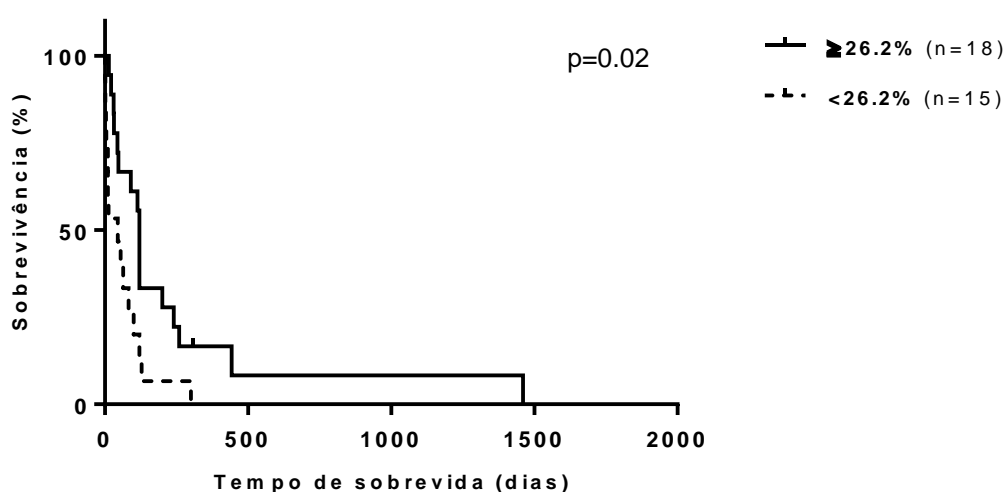
Gráfico 12 – Análise de correlação de *Spearman* entre a concentração de hemoglobina e o tempo de sobrevivência



3.5. Análise de sobrevivência consoante o valor limite/cut-off para o hematócrito (26.2%), contagem de eritrócitos ($3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$) e concentração de hemoglobina (8.97 g/dl)

Os cães com um hematócrito superior ou igual a 26.2% obtiveram uma mediana de sobrevivência superior (120 dias) comparativamente aos que apresentaram um valor inferior a 26.2% (45 dias). As curvas de sobrevivência estão ilustradas no gráfico 13, tendo sido obtida uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.02$).

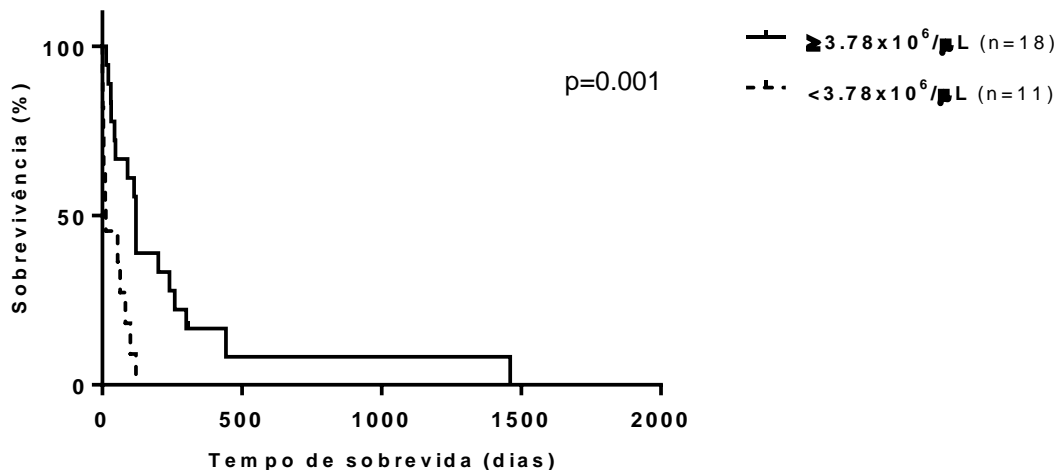
Gráfico 13 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais com um valor de hematócrito $\geq 26.2\%$ e $< 26.2\%$



Também se verificou uma maior sobrevivência dos animais com uma contagem de eritrócitos superior ou igual a $3,78 \times 10^6/\mu\text{l}$ (120 dias), face aos que revelaram um valor

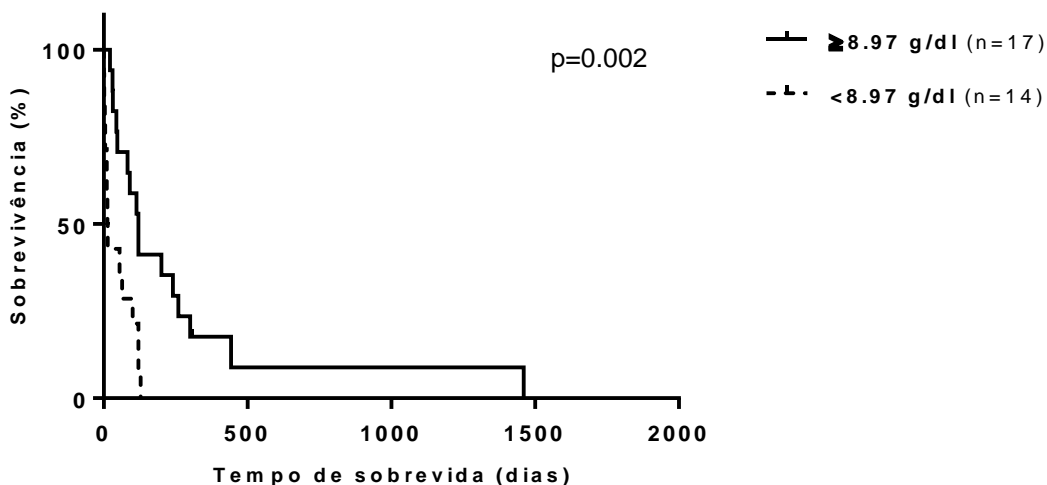
inferior a $3,78 \times 10^6/\mu\text{l}$ (13 dias). A diferença estatística entre as curvas de sobrevivência representadas no gráfico 14 foi significativa ($p=0.01$).

Gráfico 14 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais com uma contagem de eritrócitos $\geq 3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$ e $< 3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$



Por último, foi analisada a sobrevivência dos elementos da amostra caracterizados por uma concentração de hemoglobina superior ou igual 8.97 g/dl, e inferior a 8.97 g/dl (gráfico 15). A mediana de sobrevivência do primeiro grupo (120 dias) foi significativamente superior à do segundo grupo (13.5 dias) ($p=0.002$).

Gráfico 15 – Análise de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais com uma concentração de hemoglobina ≥ 8.97 g/dl e < 8.97 g/dl



Em suma, a mediana de sobrevivência entre os grupos em função dos valores limite/*cut-off* estabelecidos para os diferentes parâmetros eritrocitários foi significativamente diferente (tabela 10). A mediana de sobrevivência dos grupos de animais nos quais se verificaram

valores inferiores aos limites definidos, foi significativamente inferior à registrada nos grupos caracterizados por valores superiores a esses mesmos limites. Veja-se a notória diferença entre o número de elementos com ruptura (29/35) e sem ruptura esplênica (6/35), pelo que é expectável que os valores obtidos possam ser inferiores aos que se obteriam no caso de haver um equilíbrio. Nesse sentido, os valores referentes aos limites/*cut-off* estabelecidos, devem ser interpretados como meros indicadores de prognóstico e não como limites rigorosos.

Tabela 10 – Análise comparativa de sobrevivência entre os grupos definidos para os diferentes parâmetros eritrocitários (hematócrito, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina)

Parâmetro eritrocitário	Grupo	Tamanho da amostra (n)	Presença de rutura esplénica (R) ou não (NR)	Mediana de sobrevivência (dias)	p
Hematócrito (%)	≥26.2	n=18	R (n=14)	120	0.02
			NR (n=4)		
	<26.2	n=15	R (n=13)	45	
			NR (n=2)		
Contagem de eritrócitos (x10 ⁶ /μl)	≥3.78	n=18	R (n=15)	120	0.001
			NR (n=3)		
	<3.78	n=11	R (n=10)	13	
			NR (n=1)		
Concentração de hemoglobina (g/dl)	≥8.97	n=17	R (n=14)	120	0.002
			NR (n=3)		
	<8.97	n=14	R (n=13)	13.5	
			NR (n=1)		

3.6. Limitações do estudo

O fato de a amostra ser relativamente pequena pode ter influenciado a análise estatística e respectivas conclusões. Note-se o desequilíbrio observado entre o número de animais pertencentes aos estadios I (6/35), II (14/35) e III (15/35); sujeitos a esplenectomia (28/35) e esplenectomia associada a quimioterapia (7/35); e com e sem ruptura esplênica (29/35 e 6/35, respetivamente). Além disso, análise de sobrevivência dos animais sujeitos a quimioterapia peca pelo fato de o protocolo utilizado não ter sido exatamente o mesmo, nem devidamente concluído em todos os elementos da amostra.

Outra limitação importante diz respeito à recolha de informação referente à evolução clínica dos cães após realização do tratamento. O tempo de sobrevivência obtido por via telefónica correspondeu a um número de dias aproximado, pelo que a fiabilidade e veracidade da informação transmitida pode ser colocada em causa. Nesse sentido, não se descarta a sua influência negativa no resultado dos testes efetuados e respetivas conclusões. Do mesmo modo, também a perda de informação por impossibilidade de contacto dos proprietários constituiu uma lacuna.

De referir que o estadiamento não foi um processo rigoroso, na medida em que lesões compatíveis com metástases, visíveis não só no momento cirúrgico, mas também em imagens radiográficas e ecográficas, foram assumidas como verdadeiras metástases, sem qualquer confirmação histopatológica. Num estudo anterior (Clendaniel et al., 2014), apenas 50 de 73% dos fígados macroscopicamente anormais, pertencentes a animais com hemangiossarcoma esplénico, estavam metastizados, pelo que alguns dos animais do nosso estudo podem ter sido incorretamente estadiados.

Em suma, apesar das limitações aferidas, este estudo permitiu confirmar as hipóteses inicialmente formuladas. Assim, existe uma tendência para um menor tempo de sobrevivência dos animais que apresentam valores mais baixos de hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos; nos animais que se apresentem com uma rutura esplénica; e nos submetidos apenas a esplenectomia. Os valores definidos como limites/*cut-off* para os parâmetros eritrocitários (26.2% para o hematócrito, $3.78 \times 10^6/\mu\text{l}$ para a contagem de eritrócitos e 8.97 g/dl para a concentração de hemoglobina) podem ser utilizados como indicadores significativos de prognóstico nos casos de hemangiossarcoma esplénico em cães.

4. Perspetivas futuras

O presente trabalho revelou que os valores *cut-off* definidos para os parâmetros eritrocitários tiveram um valor de prognóstico estatisticamente significativo em hemangiossarcoma esplénico canino. Assim sendo, estes valores podem ser dados importantes de referir no momento em que uma decisão terapêutica tem que ser tomada, perante a suspeita da neoplasia em questão, havendo ou não rutura esplénica e/ou evidência de lesões compatíveis com metástases. No entanto, o estudo teve algumas limitações, tal como referido previamente, nomeadamente no que diz respeito à dimensão da amostra, aos critérios utilizados para o estadiamento, e à falta de rigor verificada no seguimento clínico dos animais. Assim sendo, seria interessante a realização de um estudo prospetivo, no sentido de reforçar as conclusões obtidas por este estudo, mas em larga escala.

Idealmente, o número de elementos constituintes da amostra deveria ser superior e equilibrado entre os diferentes grupos criados não só para o estadiamento clínico, mas também em função da presença ou não de rutura esplénica, e tendo em conta o tratamento efetuado (esplenectomia ou esplenectomia associada a posterior quimioterapia). Todos os animais seriam estadiados com recurso aos mesmos exames complementares, pelo menos ecografia abdominal e cardíaca, e radiografia torácica. Ainda melhor seria se as lesões compatíveis com metástases fossem confirmadas como tal por via de uma análise histopatológica, assegurando assim um estadiamento clínico o mais rigoroso possível.

Relativamente ao tratamento, todos os animais deveriam ser esplenectomizados imediatamente após a deteção da lesão suspeita de hemangiossarcoma esplénico. Posteriormente, os que fossem submetidos a quimioterapia deveriam sê-lo o mais rapidamente possível após cirurgia. O intervalo de tempo entre a esplenectomia e o início da quimioterapia seria o mais curto possível, igual para todos os animais, e com base no diagnóstico definitivo obtido a partir do baço enviado para análise histopatológica. Ao reduzir o tempo entre a deteção da lesão esplénica suspeita de hemangiossarcoma esplénico e a cirurgia, e ao reduzir o tempo entre esta última o início da quimioterapia, tentar-se-ia prevenir a progressão e disseminação tumoral. Também o protocolo de quimioterapia deveria ser sempre que possível previamente estipulado e devidamente concluído em todos os animais, para que posteriormente pudesse ser feita uma análise de sobrevivência para o protocolo eleito, e para que a comparação do tempo de sobrevivência do grupo submetido a esplenectomia e do grupo sujeito a esplenectomia com posterior quimioterapia fosse rigorosa.

Já o seguimento clínico e imagiológico dos animais deveria ser uniformizado, de modo a que fosse detetada o mais precocemente possível uma eventual recidiva. Também a data da morte deveria ser registada.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez, F. J., Hosoya, K., Lara-Garcia, A., Kisseberth, W. & Couto, G. (2013). VAC protocol for treatment of dogs with stage III hemangiosarcoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(6), 370-377.

Aronsohn, M. G., Dubiel, B., Roberts, B. & Powers, B. E. (2009). Prognosis for acute nontraumatic hemoperitoneum in the dog: a retrospective analysis of 60 cases (2003–2006). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(2), 72-77.

Banks, W. J. (1993). Hematopoiesis. In W. J. Banks, *Applied Veterinary Histology*, (3rded., pp.155-162). St. Louis, Missouri: Mosby.

Berg, R. J., Wingfield, W. E. & Hoopes, P. J. (1984). Idiopathic hemorrhagic pericardial effusion in eight dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(9), 988-992.

Bertazzolo, W., Dell'Orco, M., Bonfanti, U., Ghisleni, G., Caniatti, M., Masserdotti, C., Antoniazzi, E., Crippa, L. & Roccabianca, P. (2005). Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations. *Veterinary clinical pathology*, 34(1), 28-34.

Boes, K. M. & Durham, A. C. (2017). Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System. In J. F., Zachary, *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, (6thed., pp. 724-804). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Burton, J. H., Mitchell, L., Thamm, D. H., Dow, S. W. & Biller, B. J. (2011). Low-Dose Cyclophosphamide Selectively Decreases Regulatory T Cells and Inhibits Angiogenesis in Dogs with Soft Tissue Sarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(4), 920-926.

Cesta, M. F. (2006). Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 34(5), 455-465.

Cherrington, J. M., Strawn, L. M. & Shawver, L. K. (2000). New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents, *Advances in Cancer Research*, 79, 1-38.

Christensen, N. I., Canfield, P. J., Martin, P. A., Krockenberger, M. B., Spielman, D. S., & Bosward, K. L. (2009). Cytopathological and histopathological diagnosis of canine splenic disorders. *Australian veterinary journal*, 87(5), 175-181.

Clendaniel, D. C., Sivacolundhu, R. K., Sorenmo, K. U., Donovan, T. A., Turner, A., Arteaga, T. & Bergman, P. J. (2014). Association between macroscopic appearance of liver lesions and liver histology in dogs with splenic hemangiosarcoma: 79 cases (2004–2009). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 50(4), 6-10.

Cleveland, M. J. & Casale, S. (2016). Incidence of malignancy and outcomes for dogs undergoing splenectomy for incidentally detected nonruptured splenic nodules or masses:

105 cases (2009–2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248(11), 1267-1273.

Clifford, C. A., Hughes, D., Beal, M. W., Mackin, A. J., Henry, C. J., Shofer, F. S. & Sorenmo, K. U. (2001). Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(2), 131-135.

Clifford, C. A. & Lorimier, L. (2017). Hemangiosarcoma. In: S.J. Ettinger, E.C. Feldman & E. Côté, *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (8^a ed., pp. 2091-2100). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Clifford, C. A., Pretorius, E. S., Weisse, C., Sorenmo, K. U., Drobatz, K. J., Siegelman, E. S. & Solomon, J. A. (2004). Magnetic resonance imaging of focal splenic and hepatic lesions in the dog. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(3), 330-338.

Collard, F., Nadeau, M. E. & Carmel, É. N. (2010). Laparoscopic splenectomy for treatment of splenic hemangiosarcoma in a dog. *Veterinary surgery*, 39(7), 870-872.

Couto, C.G. (2014a). Complications of Cancer Chemotherapy. In R.W. Nelson & C.G. Couto, *Small Animal Internal Medicine*, (5^aed., pp.1138-1143). St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.

Couto, C.G. (2014b). Practical Chemotherapy. In R.W. Nelson & C.G. Couto, *Small Animal Internal Medicine*, (5^aed., pp.1138-1143). St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.

Craig, L. E. (2001). Cause of death in dogs according to breed: a necropsy survey of five breeds. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37(5), 438-443.

Cuccovillo, A. & Lamb, C. R. (2002). Cellular features of sonographic target lesions of the liver and spleen in 21 dogs and a cat. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 43(3), 275-278.

Dervisis, N. G., Dominguez, P. A., Newman, R. G., Cadile, C. D. & Kitchell, B. E. (2011). Treatment with DAV for advanced-stage hemangiosarcoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(3), 170-178.

Devita Jr, V. T. (1983). The James Ewing lecture. The relationship between tumor mass and resistance to chemotherapy. Implications for surgical adjuvant treatment of cancer. *Cancer*, 51(7), 1209-1220.

Dickerson, E. B., Thomas, R., Fosmire, S. P., Lamerato-Kozicki, A. R., Bianco, S. R., Wojcieszyn, J. W., Breen, M. & Modiano, J. F. (2005). Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Veterinary pathology*, 42(5), 618-632.

Dillon, A. R., Hankes, G. H., Nachreiner, R. F. & Redding, R. W. (1980). Experimental hemorrhage in splenectomized and nonsplenectomized dogs. *American journal of veterinary research*, 41(5), 707-711.

Dobson, J.M., (2011). Tumours of the spleen. In: J.M. Dobson & B.D.X. Lasceller (Eds.), *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (3^a ed., pp. 304-308). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal of Veterinary Association.

Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (2010a). The Spleen. In K.M., Dyce, W.O. Sack & C.J.G. Wensing, *Textbook of veterinary Anatomy*, (4^aed., pp.264-265). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (2010b). The Spleen. In K.M., Dyce, W.O. Sack & C.J.G. Wensing, *Textbook of veterinary Anatomy*, (4^aed., pp.439-440). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Edwards, N. J. (1996). The diagnostic value of pericardial fluid pH determination. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 32(1), 63-67.

Elmslie, R. E., Glawe, P. & Dow, S. W. (2008). Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *Journal of veterinary internal medicine*, 22(6), 1373-1379.

Eurell, J. A. & Frappier, B. L. (2006). *Dellmann's textbook of veterinary histology*. (6^a ed.). Iowa: Blackwell Publishing.

Ferrer, L., Fondevila, D., Rabanal, R. M. & Vilafranca, M. (1995). Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *Journal of comparative pathology*, 112(4), 319-326.

Fife, W. D., Samii, V. F., Drost, W. T., Mattoon, J. S. & Hoshaw-Woodard, S. (2004). Comparison between malignant and nonmalignant splenic masses in dogs using contrast-enhanced computed tomography. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 45(4), 289-297.

Finotello, R., Stefanello, D., Zini, E. & Marconato, L. (2017). Comparison of doxorubicin–cyclophosphamide with doxorubicin–dacarbazine for the adjuvant treatment of canine hemangiosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, 15(1), 25-35.

Fossum, T.W. (2013). Surgery of the spleen. In: T.W. Fossum, C.W. Dewey, C.V. Horn, A.L. Johnson, C.M. MacPhail, M.G. Radlinsky, K.S. Schulz & M.D. Willard, *Small Animal Surgery*. (4^a ed., pp. 692-704). St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.

Frank, P. M. (2013). The Peritoneal Space. In D. E. Thrall, *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*, (6^aed., pp.659-667). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Frenz, M., Kaup, F. J. & Neumann, S. (2014). Serum vascular endothelial growth factor in dogs with haemangiosarcoma and haematoma. *Research in veterinary science*, 97(2), 257-262.

Gamlem, H., Nordstoga, K., & Arnesen, K. (2008). Canine vascular neoplasia—a population-based clinicopathologic study of 439 tumours and tumour-like lesions in 420 dogs. *Apmis*, 116(s125), 41-54.

Gardner, H. L., London, C. A., Portela, R. A., Nguyen, S., Rosenberg, M. P., Klein, M. K., Clifford, C., Thamm, D.H., Vail, D.M., Bergman, P., Crawford-Jakubiak, M., Henry, C., Locke, J. & Garrett, L.D. (2015). Maintenance therapy with toceranib following doxorubicin-based chemotherapy for canine splenic hemangiosarcoma. *BMC veterinary research*, 11(1), 131.

Gaspar, T. B., Henriques, J., Marconato, L., & Queiroga, F. L. (2018). The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs—insight into a modern cancer field. *Veterinary and comparative oncology*, 16(1), 2-11.

Göritz, M., Müller, K., Krastel, D., Staudacher, G., Schmidt, P., Kühn, M., Nickel R. & Schoon, H. A. (2013). Canine splenic haemangiosarcoma: influence of metastases, chemotherapy and growth pattern on post-splenectomy survival and expression of angiogenic factors. *Journal of comparative pathology*, 149(1), 30-39.

Gustafson, D.L. & Page, R.L. (2013). Cancer Chemotherapy. In S.J. Withrow, D.M. Vail & R.L. Page, *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5^a ed., pp. 157-179). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Hammer, A. S., Bailey, M. Q. & Sagartz, J. E. (1993). Retrospective assessment of thoracic radiographic findings in metastatic canine hemangiosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 34(4), 235-238.

Hammer, A. S., Couto, C. G., Filppi, J., Getzy, D., & Shank, K. (1991). Efficacy and toxicity of VAC chemotherapy (vincristine, doxorubicin, and cyclophosphamide) in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5(3), 160-166.

Hammer, A. S., Couto, C. G., Swardson, C. & Getzy, D. (1991). Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 5(1), 11-14.

Hammond, T. N. & Pesillo-Crosby, S. A. (2008). Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(4), 553-558.

Hargis, A. M., Ihrke, P. J., Spangler, W. L. & Stannard, A. A. (1992). A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. *Veterinary Pathology*, 29(4), 316-328.

Hayes, A. (2007). Cancer, cyclo-oxygenase and nonsteroidal anti-inflammatory drugs—can we combine all three?. *Veterinary and comparative oncology*, 5(1), 1-13.

Hirsch, V. M., Jacobsen, J. & Mills, J. H. L. (1981). A retrospective study of canine hemangiosarcoma and its association with acanthocytosis. *The Canadian Veterinary Journal*, 22(5), 152.

Holloway, A.A. (2000). Disseminated Intravascular Coagulation. M.J. Day, A. Mackin & J.D. Littlewood (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, (pp.253-260). Quedgeley. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Holt, D., Van, T. W., Schelling, C. & Prymak, C. (1992). Correlation between thoracic radiographs

and postmortem findings in dogs with hemangiosarcoma: 77 cases (1984-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(10), 1535-1539.

Ivančić, M., Long, F. & Seiler, G. S. (2009). Contrast harmonic ultrasonography of splenic masses and associated liver nodules in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(1), 88-94.

Jakab, C., Halász, J., Kiss, A., Schaff, Z., Rusvai, M., Gálfi, P., Abonyi, T.Z. & Kulka, J. (2009). Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histology and histopathology*, 24(7), 801.

Johnson, K. A., Powers, B. E., Withrow, S. J., Sheetz, M. J., Curtis, C. R. & Wrigley, R. H. (1989). Splenomegaly in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 3(3), 160-166.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2011). Baço. In L. C. Junqueira & J. Carneiro, *Histologia Básica*, (11ªed., pp.275-279). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kerr, M. G. (2002). The Red Blood Cells (Erythrocytes). In M. G. Kerr, *Veterinary laboratory medicine: clinical biochemistry and haematology*. (2ª ed., pp.3-34). Oxford: Blackwell Science Ltd.

Kim, S. E., Liptak, J. M., Gall, T. T., Monteith, G. J. & Woods, J. P. (2007). Epirubicin in the adjuvant treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: 59 cases (1997–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(10), 1550-1557.

Keyes, M. L., Rush, J. E., Morais, H. S. A. & Couto, C. G. (1993). Ventricular arrhythmias in dogs with splenic masses. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 3(1), 33-38.

Kirby, G. M., Mackay, A., Grant, A., Woods, P., McEwen, B., Khanna, C., Macri, J., Hayes, M.A. & Stalker, M. (2011). Concentration of lipocalin region of collagen XXVII alpha 1 in the serum of dogs with hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(3), 497-503.

Knapp, D. W., Aronsohn, M. G. & Harpster, N. K. (1993). Cardiac arrhythmias associated with mass lesions of the canine spleen. *Journal (USA)*.

Lamerato-Kozicki, A. R., Helm, K. M., Jubala, C. M., Cutter, G. C. & Modiano, J. F. (2006). Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Experimental hematology*, 34(7), 870-878.

Larson, M. M. (2013). Radiology of the spleen. In D. E. Thrall, *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*, (6thed., pp.694-704). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Linder, K. (2017). Tumors of the spleen. In D.J. Meuten (Eds.), *Tumors in Domestic Animals*, (5thed., pp.307-214). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Liptak, J. M., Dernell, W. S., Ehrhart, E. J., Rizzo, S. A., Rooney, M. B. & Withrow, S. J. (2004). Retroperitoneal sarcomas in dogs: 14 cases (1992–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(9), 1471-1477.

Locke, J. E. & Barber, L. G. (2006). Comparative aspects and clinical outcomes of canine renal hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(4), 962-967.

Mallinckrodt, M. J. & Gottfried, S. D. (2011). Mass-to-splenic volume ratio and splenic weight as a percentage of body weight in dogs with malignant and benign splenic masses: 65 cases (2007–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239(10), 1325-1327.

Marino, D. J., Matthiesen, D. T., Fox, P. R., Lesser, M. B., & Stamoulis, M. E. (1994). Ventricular arrhythmias in dogs undergoing splenectomy: a prospective study. *Veterinary surgery*, 23(2), 101-106.

Maruyama, H., Miura, T., Sakai, M., Koie, H., Yamaya, Y., Shibuya, H., Sato, T., Watari, T., Takeuchi, A., Tokuriki, M. & Hasegawa, A. (2004). The incidence of disseminated intravascular coagulation in dogs with malignant tumor. *Journal of veterinary medical science*, 66(5), 573-575.

Mauldin, G. E., Fox, P. R., Patnaik, A. K., Bond, B. R., Mooney, S. C. & Matus, R. E. (1992). Doxorubicin-Induced Cardiotoxicosis Clinical Features in 32 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(2), 82-88.

Mescher, A. L. (2016). The Immune System and Lymphoid Organs. In A. L. Mescher, *Junqueira's basic histology: text and atlas*. (14thed., pp.267-293). United States: Mcgraw-hill.

Messick, J. (2006). Blood and Bone Marrow. In J. O. Eurell & B. L. Frappier, *Dellman's Textbook of Veterinary Histology*, (6thed., pp.61-78). Iowa: Blackwell Publishing.

Mills, J. (2000). Anaemia. In M. J. Day, A. Mackin, J. D. Littlewood (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, (pp.29-41). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Morrison, W. B. & DeNicola, D. B. (1993, November). Advantages and disadvantages of cytology and histopathology for the diagnosis of cancer. In *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)* (Vol. 8, No. 4, pp. 222-227).

Ng, C. Y. & Mills, J. N. (1985). Clinical and haematological features of haemangiosarcoma in dogs. *Australian veterinary journal*, 62(1), 1-4. Nikula, K. J., Benjamin,

- S. A., Angleton, G. M., Saunders, W. J. & Lee, A. C. (1992). Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs. *Radiation research*, 129(1), 11-18.
- North, S. & Banks, T. (2009). Principles of chemotherapy. In S. North & T. Banks, *Small Animal Clinical Oncology: An Introduction*, (pp. 31-43). London: Saunders Elsevier.
- North, S. & Banks, T. (2009). Tumours of the spleen. In S. North & T. Banks, *Small Animal Clinical Oncology: An Introduction*, (pp. 237-242). London: Saunders Elsevier.
- Ogilvie, G. K., Powers, B. E., Mallinckrodt, C. H. & Withrow, S. J. (1996). Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(6), 379-384.
- Ohlerth, S., Dennler, M., Rüefli, E., Hauser, B., Poirier, V., Siebeck, N., Roos, M. & Kaser-Hotz, B. (2008). Contrast harmonic imaging characterization of canine splenic lesions. *Journal of veterinary internal medicine*, 22(5), 1095-1102.
- O'Keefe, D. A. & Couto, C. G. (1987). Fine-Needle Aspiration of the Spleen as an Aid in the Diagnosis of Splenomegaly. *Journal of veterinary internal medicine*, 1(3), 102-109.
- Ovejero, A. B. & Hauser, B. (2007). Correlation between cytopathology and histopathology of the skin, lymph node and spleen in 500 dogs and cats. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 149(6), 249-257.
- Payne, S. E., Rassnick, K. M., Northrup, N. C., Kristal, O., Chretien, J. D., Cotter, S. M., Kintzer, P., Frimberger, A.E., Morrison-Collister, K.E., Wood, C.A. & Moore, A. S. (2003). Treatment of vascular and soft-tissue sarcomas in dogs using an alternating protocol of ifosfamide and doxorubicin. *Veterinary and comparative oncology*, 1(4), 171-179.
- Pintar, J., Breitschwerdt, E. B., Hardie, E. M. & Spaulding, K. A. (2003). Acute nontraumatic hemoabdomen in the dog: a retrospective analysis of 39 cases (1987–2001). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(6), 518-522.
- Prymak, C., McKee, L. J., Goldschmidt, M. H. & Glickman, L. T. (1988). Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(6), 706-712.
- Rassnick, K. M., Frimberger, A. E., Wood, C. A., Williams, L. E., Cotter, S. M. & Moore, A. S. (2000). Evaluation of ifosfamide for treatment of various canine neoplasms. *Journal of veterinary internal medicine*, 14(3), 271-276.
- Richter, M. C. (2012). Spleen. In K. M. Tobias & S. A. Johnston, *Veterinary Surgery Small Animal* (1sted., pp.1341-1352). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Rizzi, T. E., Meinkoth, J. H., Clinkenbeard, K. D. (2010) Normal Haematology of the Dog. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Haematology*, (3rded., pp.799-810). Iowa: Blackwell Publishing.
- Rossi, F., Leone, V. F., Vignoli, M., Laddaga, E. & Terragni, R. (2008). Use of contrast-enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. *Veterinary radiology & ultrasound*, 49(2), 154-164.

Schultheiss, P. C. (2004). A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16(6), 522-526.

Sisson, D., Thomas, W. P., Ruehl, W. W. & Zinkl, J. G. (1984). Diagnostic value of pericardial fluid analysis in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184(1), 51-55.

Smith, A. N. (2003). Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(3), 533-552.

Snyder, J. M., Lipitz, L., Skorupski, K. A., Shofer, F. S. & Van Winkle, T. J. (2008). Secondary intracranial neoplasia in the dog: 177 cases (1986–2003). *Journal of veterinary internal medicine*, 22(1), 172-177.

Sorenmo, K. U., Baez, J. L., Clifford, C. A., Mauldin, E., Overley, B., Skorupski, K., Bachman, R., Samluk, M. & Shofer, F. (2004). Efficacy and Toxicity of a Dose-Intensified Doxorubicin Protocol in Canine Hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(2), 209-213.

Sorenmo, K., Duda, L., Barber, L., Cronin, K., Sammarco, C., Usborne, A., Goldschmidt, M. & Shofer, F. (2000). Canine hemangiosarcoma treated with standard chemotherapy and minocycline. *Journal of veterinary internal medicine*, 14(4), 395-398.

Sorenmo, K. U., Jeglum, K. A. & Helfand, S. C. (1993). Chemotherapy of canine hemangiosarcoma with doxorubicin and cyclophosphamide. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(6), 370-376.

Sorenmo, K., Samluk, M., Clifford, C., Baez, J., Barrett, J. S., Poppenga, R., Overley, B., Skorupski, K., Oberthaler, K., Winkle, T.V., Seiler, G. & Shofer F. (2007). Clinical and pharmacokinetic characteristics of intracavitary administration of pegylated liposomal encapsulated doxorubicin in dogs with splenic hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(6), 1347-1354.

Spangler, W. L. & Culbertson, M. R. (1992). Prevalence, type, and importance of splenic diseases in dogs: 1,480 cases (1985-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(6), 829-834.

Spangler, W. L. & Kass, P. H. (1997). Pathologic factors affecting postsplenectomy survival in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(3), 166-171.

Teske, E., Rutteman, G. R., Kirpenstein, J. & Hirschberger, J. (2011). A randomized controlled study into the efficacy and toxicity of pegylated liposome encapsulated doxorubicin as an adjuvant therapy in dogs with splenic haemangiosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, 9(4), 283-289.

Thamm, D.H. (2013). Hemangiosarcoma. In S.J. Withrow, D.M. Vail & R.L. Page, *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5^a ed., pp. 679- 688). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Thamm, D. H., Kamstock, D. A., Sharp, C. R., Johnson, S. I., Mazzaferro, E., Herold, L. V., Barnes, S.M., Winkler, K. & Selting, K. A. (2012). Elevated serum thymidine kinase activity in canine splenic hemangiosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, 10(4), 292-302.

Thrall, M.A. (2012). Classification of and Diagnostic Approach to Anemia. In M.A. Thrall, G. Weiser, R.W. Allison & T.W. Capbell (Eds.), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nded., pp.75-80). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Thurston, G. (2003). Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell and tissue research*, 314(1), 61-68.

Thurston, G., & Gale, N. W. (2004). Vascular endothelial growth factor and other signaling pathways in developmental and pathologic angiogenesis. *International journal of hematology*, 80(1), 7.

Tillson, D.M. (2003). Spleen. In D. Slatter, *Textbook of Small Animal Surgery*, (3rded., pp. 1046-1062). Philadelphia: Elsevier Science.

Tvedten, H. (2010). Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Haematology*, (3rded., pp.152-161). Iowa: Blackwell Publishing.

U'ren, L. W., Biller, B. J., Elmslie, R. E., Thamm, D. H. & Dow, S. W. (2007). Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(1), 113-120.

Vail, D. M., MacEwen, E. G., Kurzman, I. D., Dubielzig, R. R., Helfand, S. C., Kisseberth, W. C., London, C.A., Obradovich, J.E., Madewell, B.R., Rodriguez, C.O., Fidel, J., Susaneck, S. & Rosenberg, M. (1995). Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clinical Cancer Research*, 1(10), 1165-1170.

Vail, D. M. (2009). Supporting the veterinary cancer patient on chemotherapy: neutropenia and gastrointestinal toxicity. *Topics in companion animal medicine*, 24(3), 122-129.

Valenciano, A. C., Cowell, R., Rizzi, T. & Tyler, R. D. (2013). *Atlas of Canine and Feline Peripheral Blood Smears*. St.Louis: Elsevier Mosby.

Valli, V. E. O., Kiupel, M. & Bienzle D. (2016). Hematopoietic System. In M. G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals* (6thed., pp.102-196). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Villiers, E. (2016). Disorders of Erythrocytes. In E. Villiers & J. Ristic (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (3rded., pp.38-66). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association

Von Beust, B. R., Suter, M. M. & Summers, B. A. (1988). Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Veterinary Pathology*, 25(4), 251-255.

Ward, H., Fox, L. E., Calderwood-Mays, M. B., Hammer, A. S. & Couto, C. G. (1994). Cutaneous hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(5), 345-348.

Ware, W. A. & Hopper, D. L. (1999). Cardiac tumors in dogs: 1982–1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(2), 95-103.

Warry, E., Bohn, A., Emanuelli, M., Thamm, D. & Lana, S. (2013). Disease distribution in canine patients with acanthocytosis: 123 cases. *Veterinary clinical pathology*, 42(4), 465-470.

Waters, D. J., Caywood, D. D., Hayden, D. W. & Klausner, J. S. (1988). Metastatic pattern in dogs with splenic haemangiosarcoma: clinical implications. *Journal of Small Animal Practice*, 29(12), 805-814.

Weiss, D. J. & Tvedten, H. (2012a). Erythrocyte Disorders. In M. D. Willard, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (5^a ed., pp.38-71). Missouri: Elsevier Saunders.

Weiss, D. J. & Tvedten, H. (2012bng &). The Complete Blood Count, Bone Marrow Examination and Blood Banking. In M. D. Willard, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (5^a ed., pp.12-31). Missouri: Elsevier Saunders

Wendelburg, K. M., O'Toole, T. E., McCobb, E., Price, L. L., Lyons, J. A. & Berg, J. (2014). Risk factors for perioperative death in dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 539 cases (2001–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(12), 1382-1390.

Wendelburg, K. M., Price, L. L., Burgess, K. E., Lyons, J. A., Lew, F. H. & Berg, J. (2015). Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(4), 393-403.

Wong, R. W., Gonsalves, M. N., Huber, M. L., Rich, L. & Strom, A. (2015). Erythrocyte and biochemical abnormalities as diagnostic markers in dogs with hemangiosarcoma related hemoabdomen. *Veterinary Surgery*, 44(7), 852-857.

Wood, C. A., Moore, A. S., Gliatto, J. M., Ablin, L. A., Berg, R. J. & Rand, W. M. (1998). Prognosis for dogs with stage I or II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy alone: 32 cases (1991-1993). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 34(5), 417-421.

Wrigley, R. H., Park, R. D., Konde, L. J. & Lebel, J. L. (1988). Ultrasonographic features of splenic hemangiosarcoma in dogs: 18 cases (1980-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(8), 1113-1117.

Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T. & Masegi, T. (2006). Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. *Veterinary Pathology*, 43(6), 971-980.

Yuki, M., Machida, N., Sawano, T. & Itoh, H. (2011). Investigation of serum concentrations and immunohistochemical localization of α 1-acid glycoprotein in tumor dogs. *Veterinary research communications*, 35(1), 1-11.